73

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1938 — N° 760

THÈSE

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Marie-Thérèse REGNIER
Née le 13 juillet 1904, à Cherbourg
Pharmacien supérieur
Docteur ès Sciences Naturelles

Contribution à l'Étude pharmacodynamique des Arsenicaux trivalents

Président : TIFFENEAU, *Professeur.*

PARIS
IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
JOUVE & Cie, ÉDITEURS
15, RUE RACINE, 15

1938

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1938 — N° ... —

THÈSE

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Marie-Thérèse REGNIER

Née le 13 juillet 1904, à Cherbourg
Pharmacien supérieur
Docteur ès Sciences Naturelles

Contribution à l'Étude pharmacodynamique des Arsenicaux trivalents

Président : TIFFENEAU, *Professeur.*

PARIS
IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
JOUVE & Cie, ÉDITEURS
15, RUE RACINE, 15

1938

DOYEN... TIFFENEAU

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	ROUVIÈRE.
Physiologie	Léon BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	POLONOVSKI.
Bactériologie	R. DEBRÉ.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales	BAUDOUIN.
Pathologie médicale	ABRAMI.
Pathologie chirurgicale	MONDOR.
Anatomie pathologique	LEROUX.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	HARVIER.
Hygiène et médecine préventive	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LAIGNEL-LAVASTINE.
Pathologie expérimentale et comparée	FIESSINGER.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	CHIRAY.
Clinique médicale	LOEPER. CARNOT. CLERC. Marcel LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance	LEREBOULLET.
Clinique des maladies des enfants	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	LEMIERRE.
Clinique chirurgicale	CUNÉO. GOSSET. GRÉGOIRE. LENORMANT.
Clinique ophtalmologique	TERRIEN.
Clinique urologique	CHEVASSU.
Clinique d'accouchements	COUVELAIRE. JEANNIN. LÉVY-SOLAL.
Clinique gynécologique	MOCQUOT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	OMBRÉDANNE.
Clinique thérapeutique médicale	RATHERY.
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique	Maurice VILLARET.
Clinique de la tuberculose	TROISIER.
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte	MATHIEU.
Clinique cardiologie	LAUBRY.
Clinique de neuro-chirurgie	Clovis VINCENT.
Assistance médico-sociale	N...
Professeurs sans chaire	HASARD. HOVELACQUE. MULON. OLIVIER. SANNIÉ. VERNE.

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.

AMELINE..... Pathologie chirurgicale.
BARIÉTY..... Pathologie médicale.
BÉNARD (H.) .. Pathologie médicale.
BERNARD (E.). Pathologie médicale.
BESANÇON (J.). Hydrologie.
BOULIN ..... Pathologie médicale.
BULLIARD .... Histologie.
CATHALA ..... Pathologie médicale.
CHEVALLIER .. Pathologie médicale.
COSTE..... Pathologie médicale.
DOGNON ..... Physique.
FEY ..... Urologie.
FUNCK..... Pathologie chirurgicale.
GALLIARD .... Parasitologie.
GASTINEL ..... Bactériologie.
DE GAUDART D'ALLAINES.. Pathologie chirurgicale.
GAYET ..... Physiologie.
DE GENNES ... Pathologie médicale.
GIROUD ..... Histologie.
HAGUENAU ... Pathologie médicale.
HALPHEN ..... Oto-rhino-laryngologie.
HUGUENIN .... Anatomie pathologique.
JOANNON ..... Hygiène.

MM.

LACOMME ..... Obstétrique.
LANTUÉJOUL .. Obstétrique.
LAROCHE (G.).. Pathologie médicale.
LAVIER..... Parasitologie.
LELONG..... Pathologie médicale.
LEMAIRE ..... Pathologie expérimentale.
LEVEUF ..... Pathologie chirurgicale.
Mlle J. LÉVY.... Pharmacologie.
LÉVY-VALENSI. Neurologie et Psychiâtrie.
MÉNÉGAUX... Pathologie chirurgicale.
MOLLARET.... Pathologie médicale.
MOREAU ..... Pathologie médicale.
MOULONGUET.. Pathologie chirurgicale.
MOUQUIN ..... Pathologie médicale.
PETIT-DUTAILLIS.. Pathologie chirurgicale.
PIÉDELIÈVRE .. Médecine légale.
PORTES ..... Obstétrique.
RENARD..... Ophtalmologie.
RICHET ..... Physiologie.
SÉNÈQUE ..... Pathologie chirurgicale.
TURPIN ..... Pathologie médicale.
VIGNES ..... Obstétrique.
WILMOTH ..... Pathologie chirurgicale.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

POUR LE SERVICE DES EXAMENS

MM.

ALGLAVE ..... Pathologie chirurgicale.
BUSQUET ..... Pharmacologie.
CHAILLEY-BERT.. Physiologie.
GUÉNIOT..... Obstétrique.
HEITZ-BOYER... Pathologie chirurgicale.

MM.

LARDENNOIS.... Pathologie chirurgicale.
LE LORIER..... Obstétrique.
NEVEU-LEMAIRE Parasitologie
SCHWARTZ..... Pathologie chirurgicale.
VAUDESCAL..... Obstétrique.

90315

IV. — AGREGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

A TITRE PERMANENT

MM.	
ALAJOUANINE. AUBERTIN. BRULÉ. CHABROL. DONZELOT. DUVOIR. LIAN. VALLERY-RADOT (Pasteur). SÉZARY.	Clinique médicale.

MM.	
BASSET. BROCQ. CADENAT. GATELLIER. MOURE. QUENU. VELTER.	Clinique chirurgicale.

MM.	
ÉCALLE. METZGER.	Clinique obstétricale.

V. — CHARGÉS DE COURS

MM.	
CHAILLEY-BERT, agrégé	Éducation physique
LEDOUX-LEBARD	Radiologie clinique
RUPPE	Stomatologie.
WEIL-HALLÉ	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

MEIS ET AMICIS

A MES MAITRES DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

A MES MAITRES DE LA FACULTÉ DES SCIENCES

A MES MAITRES DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

A MES MAITRES DES HOPITAUX

A Monsieur le Professeur TIFFENEAU

Doyen de la Faculté de Médecine de Paris
Membre de l'Académie de Médecine
Officier de la Légion d'honneur

Avec l'expression de mes sentiments respectueux.

A Mademoiselle Jeanne LEVY

Professeur agrégé à la Faculté de Médecine de Paris
Directeur du Laboratoire de contrôle physiologique
de l'Académie de Médecine

En témoignage de ma vive reconnaissance.

INTRODUCTION

Les composés arsenicaux de la série du benzène sont utilisés en thérapeutique pour lutter contre les Trypanosomes, les Tréponèmes de la syphilis, les Protozoaires de la malaria et les Spirilles. On classe ces composés en deux groupes principaux :

1° les dérivés arsiniques du type $R - As \begin{matrix} \diagup OH \\ = O \\ \diagdown OH \end{matrix}$ à arsenic pentavalent ;

2° les dérivés arsénoïques ou Arsénobenzènes du type $R - As = As - R$, à arsenic trivalent.

R représente, dans les deux cas, un noyau benzénique dont certains atomes d'hydrogène sont remplacés par divers radicaux. La présence d'un groupement aminé substitué ou non, en position méta ou para par rapport à l'arsenic, paraît indispensable à l'action parasiticide. Les arsenicaux trivalents ont une action trypanocide plus rapide que celle des composés à arsenic pentavalent ; aussi les utilise-t-on très fréquemment en thérapeutique malgré leur moindre stabilité.

En effet, la clinique, d'accord avec le contrôle physiologique, a constaté que des échantillons d'Arsénobenzol préparés dans des conditions en apparence identiques pouvaient présenter de grandes différences de toxicité.

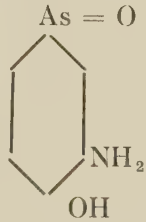
Thiroux a publié, dans un rapport à l'Office International

d'Hygiène sur les Arsénobenzols, l'observation suivante : une fabrication (8 à 10 kg.) est desséchée dans une étuve à plusieurs étages ; la quantitée séchée sur un rayon constitue un lot. Cette dessiccation est l'ultime opération de la fabrication, le produit étant réparti ensuite en ampoules. Or, d'un lot à l'autre, il existe des variations importantes dans la composition chimique et la détermination du taux en arsenic des lots permet de constater des différences de plusieurs unités pour cent. De plus, la toxicité varie simultanément. A dose égale, 0 g., 30 par kilogramme de lapin, certains lots se montrent inoffensifs tandis que d'autres se révèlent très toxiques.

L'étude s'impose de déterminer ce qui, dans la nature des différents échantillons d'Arsénobenzol, provoque cette variation de la toxicité. La disparition des accidents parfois constatés, particulièrement la crise nitritoïde, pourrait en résulter.

Pour Erhlich (1913), l'augmentation de la toxicité du 606 observée en laissant ce corps s'oxyder à l'air est due à la formation d'arsénoxyde.

L'oxyde hydroxyaminophénylarsenic ou arsénoxyde, produit de la réduction incomplète de l'Arsénobenzol, a pour formule :

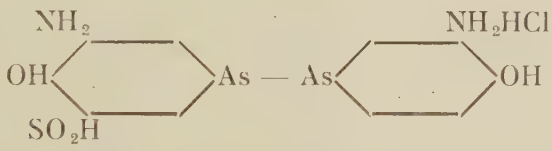


Ce produit serait vingt fois plus toxique que le Salvarsan. Toutefois, pour Pomaret, il ne pourrait être rendu responsable des crises nitritoïdes, celles-ci s'accompagnant d'abaissement de la pression sanguine et l'arsénoxyde pur possédant la propriété d'élever la tension artérielle.

D'après le *Medical Research Committee*, la toxicité de l'arsénoxyde serait beaucoup moins forte que ne le prétend Erhlich et ce corps ne serait pour rien dans les variations de toxicité du Salvarsan.

Erhlich et Bertheim montrent que, lors de la préparation de l'Arsénobenzène, il peut se former, pendant le stade de réduction, des composés contenant du soufre, plus toxiques. Mais. Pymam prétend que le Salvarsan commercial contient toujours plus ou moins de soufre et qu'il ne paraît pas en résulter d'augmentation de la toxicité.

En 1921, King note qu'au cours de la préparation du Salvarsan, il se forme, pendant la réduction par l'hydrosulfite de sodium de l'acide nitrodioxyhydrophénylarsénique, un composé sulfuré, le diamino-dihydroxylsulfurarsénobenzène :



Ce corps serait deux fois plus toxique et moins actif sur la Souris infestée par le *Trypanosoma equiperdum*, que le Salvarsan.

Christiansen, en 1923, trouve également ce dérivé sulfuré et peut en fixer la toxicité chez le Rat. La mort des animaux se produit pour une dose de 0 g., 04 par kilogramme.

D'autres auteurs attribuent les modifications de la toxicité à des changements d'état physique des préparations employées et, en particulier, à la présence, en quantités variables, de traces d'impuretés de nature colloïdale. Ces impuretés, non forcément toxiques par elles-mêmes, pourraient agir en modifiant l'état physique du produit. Un fait semble bien montrer l'importance de cet état physique, l'injection de 606 en solution acide est souvent suivie d'accidents. Dans ce cas, en effet, il se produit, comme le

montrent notamment Janselme et Pomaret, des précipitations au contact du sang. Pomaret, en outre, réalise des crises nitritoïdes expérimentales chez le Chien en injectant par voie intraveineuse du Novarsénobenzol en solution acide. Par contre, en solution alcaline, il n'observe ni hypotension, ni accident.

Pour Reid Hunt, certains Arsénobenzènes seraient très toxiques lorsqu'on les dissout à la température ordinaire. La toxicité diminuerait beaucoup, en chauffant modérément ces solutions ou en les laissant quelque temps à la température de la chambre. Pour cet auteur, le phénomène serait dû à des modifications de l'état physique de la solution. En outre, il existerait parfois dans les Arsénobenzènes commerciaux d'autres composés arsenicaux très nocifs pour l'Homme.

Oliver montre qu'en ajoutant de la gélatine à une solution d'Arsénobenzène, on diminue la toxicité, et il distingue entre la toxicité immédiate ou physique et la toxicité lointaine ou chimique.

Voegtlin, Johnson et Dyer constatent que les solutions d'Arsénobenzène, placées dans des conditions où elles ne peuvent être oxydées, subissent peu à peu une diminution de leur viscosité et de leur nocivité.

Selon De Myttenaere, la cause principale de la toxicité des Arsénobenzènes est la présence d'arsenic précipitable par l'hydrogène sulfuré.

La question semble donc très controversée et rien ne permet d'attribuer à tel ou tel facteur la toxicité de certains arsenicaux trivalents.

Je me suis proposé d'apporter une contribution à la solution de cet important problème.

Voici le plan que j'ai suivi pour l'exposé de ce travail :

INTRODUCTION.

PREMIÈRE PARTIE. — **Etude de la toxicité des arsenicaux trivalents.**

Chapitre I. — *Notions générales sur la toxicité.*

Chapitre II. — *Détermination de la toxicité du Novarsénobenzène sur la Souris blanche.*

Chapitre III. — *Modification de la toxicité du Novarsénobenzène suivant la voie d'introduction.*
1° Chez le Rat.
2° Chez la Souris.

Chapitre IV. — *Détermination de la toxicité du produit d'oxydation du Novarsénobenzène.*
Rapport existant entre l'intensité de la couleur et la toxicité des solutions abandonnées à l'air.

Chapitre V. — *Essai de généralisation des résultats obtenus.*
1° Au Sulfarsénobenzène.
Rôle de la voie d'introduction.
Rôle de l'abandon à l'air des solutions.
2° A la Colchicine.

DEUXIÈME PARTIE. — **Etude de l'action trypanocide des arsenicaux trivalents.**

Chapitre I. — *Méthodes de recherche de l'action trypanocide.*

Chapitre II. — *Modification de l'action trypanocide, suivant la voie d'introduction du produit.*

Chapitre III. — *Action trypanocide du produit d'oxydation du Novarsénobenzène.*

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Qu'il me soit permis, avant d'exposer les résultats de mes recherches, de remercier ceux qui, successivement, ont contribué à ma formation scientifique.

J'exprime, tout d'abord, ma vive reconnaissance à mes Maîtres de la Faculté de Pharmacie de Paris qui m'ont fait franchir la première étape de ma vie universitaire.

Je tiens à dire, plus particulièrement, ma gratitude à M. le Professeur Launoy dont les leçons de pharmacodynamie ont marqué une influence si profonde qu'elles ont décidé de mon orientation, et à M. le Professeur René Fabre qui, depuis dix ans, n'a cessé de me prodiguer les conseils les plus précieux et dont la vie de labeur fut, pour moi, le meilleur des exemples.

A la Faculté des Sciences, M. le Professeur Caullery, après m'avoir montré tout l'attrait de la Biologie, m'a accueillie dans son Laboratoire. C'est sous sa direction éclairée que j'ai préparé ma thèse de Doctorat ès Sciences et que je poursuis maintenant encore mes travaux sur l'action des hormones sexuelles sur les Cyprinodontes vivipares. Je le prie de trouver ici le témoignage de ma vive reconnaissance et de mon respectueux dévouement.

De mes Maîtres de la Faculté de Médecine et des Hôpitaux, je conserve le meilleur souvenir. Qu'ils veuillent bien être remerciés des précieux enseignements qu'ils m'ont prodigués.

J'exprime à M. le Doyen Tiffeneau toute ma reconnaissance pour l'insigne honneur qu'il me fait en acceptant la présidence de cette thèse.

Je suis heureuse de remercier, tout spécialement, Mlle Jeanne Lévy, Professeur agrégé à la Faculté, pour l'accueil qu'elle m'a toujours réservé, pour les directives qu'elle m'a données et les moyens qu'elle a mis à ma disposition.

M. le Professeur Hazard veut bien une fois encore se

pencher sur mes travaux. C'est, en effet, sur son rapport, que m'a été attribuée une médaille d'or de la Société de Pharmacie de Paris. Je lui adresse toute ma gratitude.

Je remercie M. le Professeur Busquet dont l'accueil a toujours été, pour moi, si cordial et qui a bien voulu faire partie du jury de cette thèse.

A mon camarade Georges Antoine je dis toute ma reconnaissance.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE DE LA TOXICITÉ DES ARSENICAUX TRIVALENTS

CHAPITRE PREMIER

Notions générales sur la toxicité.

La détermination de la toxicité fut longtemps la seule méthode utilisée en pharmacologie pour rendre compte de la valeur d'un médicament. Des techniques très diverses peuvent être utilisées.

Tout d'abord, on doit considérer, du point de vue pharmacodynamique, plusieurs sortes de toxicité.

La toxicité peut être déterminée sur un tissu ou un organe. Par exemple, on peut rechercher la quantité de substance qui provoque la mort d'un cœur isolé de Grenouille ou d'Escargot ou même d'un fragment de sinus de cœur.

Il est possible également d'évaluer la toxicité d'une substance sur un protoplasma simple, sur un être unicellulaire, Protozoaires, Amibes, Trypanosomes. Enfin, on peut déterminer ce que Launoy appelle « toxicité globale » qui est celle qui correspond à la mort de l'individu quel qu'en soit le mécanisme.

Même si l'on n'envisage que l'évaluation de cette sorte de toxicité, les techniques sont encore fort nombreuses.

Le plus souvent, on cherche simplement la dose minimum mortelle par kilogramme. Celle-ci diffère selon l'animal sur lequel on expérimente, selon la voie d'introduction de la drogue dans l'organisme et selon la durée de l'expérience.

Le choix de l'animal sur lequel on expérimente étant

fixé, les deux procédés suivants servent à déterminer la dose minimum mortelle d'une substance :

— injection unique qui peut être soit trop faible, soit trop forte, ce qui oblige à répéter l'expérience sur un grand nombre de sujets,

— injection lente et progressive d'une solution du produit de telle sorte que, d'emblée, l'expérience fournisse un chiffre représentant la quantité minimum nécessaire pour produire la mort.

Burn a fait observer que la valeur réelle de la dose minimum mortelle ne peut s'exprimer que par le chiffre qui représente la moyenne des doses minima mortelles obtenues dans un grand nombre d'expériences identiques.

Pratiquement, comme il ne faut pas songer, pour chaque essai biologique, expérimenter sur un nombre considérable d'animaux, on prend la moyenne des doses minima mortelles obtenues dans quelques expériences et on calcule, en se basant sur les données des statistiques, l'erreur maximum que l'on peut commettre.

La détermination expérimentale directe de cette dose minimum mortelle n'est pas toujours possible. La substance à l'essai doit exercer une action immédiate, c'est-à-dire qu'elle doit pouvoir, étant introduite par une voie convenable et arrivant à concentration suffisante au point anatomique où elle exerce son action toxique, supprimer immédiatement les fonctions vitales. Le type des mesures de ce genre est la détermination de la toxicité des digitaliques selon la méthode de Hatcher-Magnus par perfusion lente, progressive et régulière jusqu'à obtention de l'arrêt cardiaque.

Certaines substances ne se prêtent pas à la détermination exacte de la dose minimum mortelle individuelle. Ce sont celles qui nécessitent pour exercer leur action, un certain temps de latence quelle que soit leur voie d'introduction.

La mort se produit par un ensemble de processus mal connus, se succédant avec une rapidité et dans un ordre plus ou moins défini. D'autres substances, tels les arsenicaux trivalents, ne se prêtent pas à l'injection intraveineuse continue.

Pour mesurer la toxicité de tels produits, il est quasi impossible d'évaluer, même approximativement, la quantité de substance qui aurait été juste suffisante pour entraîner la mort de l'animal.

Quatre valeurs différentes peuvent alors être données pour définir la toxicité de ces corps :

1° la dose maximum exceptionnellement supportée, supérieure à la dose habituellement mortelle ;
2° la dose léthale, généralement mortelle ;
3° la dose moyenne, appelée habituellement dose supportée déterminant la mort chez 50 p. 100 environ des animaux injectés ;
4° la dose minimum exceptionnellement mortelle, inférieure à la dose habituelle de survie.

Le rapport $\frac{\text{dose supportée}}{\text{dose léthale}}$ est appelé coefficient toxique.

Dans l'établissement de ces doses, il faut tenir compte du facteur temps car, si certains toxiques tuent rapidement et cela dans un temps presque invariable pour une même espèce animale, d'autres poisons ne déterminent la mort qu'après un certain laps de temps.

La voie d'introduction du produit doit toujours être mentionnée, la toxicité variant dans de très larges mesures selon le mode d'administration. Le volume des solutions doit être réduit afin de ne pas introduire un élément mécanique qui vient se surajouter à la toxicité propre de la substance. Toutefois, il est préférable d'introduire un peu plus de liquide que de recourir à une solution trop concentrée de toxique.

Malgré toutes les précautions possibles, la détermination d'une dose mortelle reste encore une opération très délicate et c'est ainsi que, quel que soit le nombre d'animaux sur lequel on s'appuie pour fixer une dose minimum mortelle, on ne peut jamais être certain que celle-ci, une fois supposée connue, déterminera, par son application sur un nouvel individu de la même espèce, la mort de celui-ci.

Une remarque analogue pourrait être faite pour les doses maxima ou léthales.

Les travaux de Trevan sur la détermination de la toxicité en tenant compte des mortalités semblent avoir apporté quelque lumière. Le procédé qu'il a indiqué est basé sur les différences de sensibilité des divers animaux d'une même espèce vis-à-vis des doses variées de substance, l'administration étant faite dans des conditions toujours identiques.

Trevan, a, en effet, montré qu'il est possible d'admettre, tout au moins pour des doses voisines de la dose minimum mortelle, que le pourcentage des mortalités varie proportionnellement aux doses administrées. Ainsi, la sensibilité individuelle d'une même espèce qui fut considérée si longtemps comme un obstacle à la précision des dosages biologiques constitue le principe même d'une méthode de dosage.

Trevan administre à quelques groupes d'animaux des doses diverses de la substance étalon et note la mortalité pour cent qui se produit, après un certain laps de temps arbitrairement choisi, chez les animaux ayant reçu la même dose. Il construit une courbe dite de mortalité en portant en abscisses les doses administrées et en ordonnées le pourcentage de morts obtenues.

Pour déterminer l'activité d'une substance par rapport à celle de l'étalon, on injecte, à un certain nombre d'animaux, une dose fixée et on note les mortalités qui s'ensuivent. En utilisant la courbe de mortalité obtenue avec l'étalon correspondant, on peut déduire du pourcentage des mortalités la dose injectée. Si l'on examine les courbes obtenues par

Trévan, on constate que, généralement, elles sont infléchies aux deux extrémités. Ces parties de la courbe ne sont donc pas utilisables car à une différence de mortalité très faible correspond un grand écart dans la dose administrée. Au milieu des courbes, correspondant pour chaque substance à des pourcentages de mortalité différents mais toujours voisins de 50 p. 100, l'erreur est la plus réduite, une différence très appréciable dans le taux de la mortalité est en rapport avec des écarts peu importants de la quantité de substance.

Pratiquement, il se pose souvent un problème un peu différent de celui qui consiste à mesurer exactement l'activité d'une substance médicamenteuse. Il s'agit de vérifier si cette substance n'a pas une toxicité beaucoup plus forte et une activité thérapeutique moindre que celle d'une préparation étalon. Dans ce cas, le contrôle biologique peut être conduit comme suit : on injecte à un certain nombre d'animaux une ou deux doses déterminées et l'on note le pourcentage des mortalités obtenues. Des règles rigoureuses, déduites des calculs de statistiques, permettent d'obtenir, d'après les doses injectées, le pourcentage des mortalités que l'on doit admettre pour qu'une substance soit déclarée suffisante, c'est-à-dire ne différant pas, par exemple, de plus de 15 à 20 p. 100 de l'étalon. C'est un essai de ce genre que le Codex préconise pour les arsenicaux trivalents.

CHAPITRE II

Détermination de la toxicité du Novarsénobenzène sur la Souris blanche.

Les études de toxicité ont été entreprises sur des Souris provenant des trois souches A, D et L du Laboratoire de contrôle de l'Académie de Médecine, comportant chacune 1.500 à 2.000 individus (1).

Les Souris sont pesées régulièrement deux fois par semaine et seules servent au contrôle celles qui ont eu une croissance régulière.

Pendant l'essai des arsenicaux, les Souris sont maintenues dans une pièce calorifugée, chauffée par un radiateur électrique et dont la température est maintenue constamment à 23°, au moyen d'un thermostat. Une ventilation fonctionne un quart d'heure sur deux, grâce à une minuterie.

Les Souris sont régulièrement nourries et ne sont pas mises à jeun avant l'injection. Elles sont maintenues pendant celle-ci dans un appareil de contention dans lequel elles respirent très librement.

Pour l'injection intra-veineuse le liquide est poussé lentement dans une des veines de la queue, préalablement trempée dans de l'eau chaude.

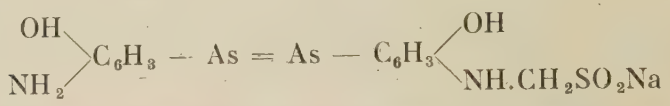
Les seringues utilisées sont divisées en 1/100e de cm³. Les unes contiennent 1 cm³ 30 et ont 7 cm., 8 de long, soit 6/10e de cm. par 1/10e de cm³. Les autres contiennent 0 cm³ 75 et ont 10 cm. de long, 1/10e de cm³ occupe donc une longueur de 1 cm., 33. Les pistons bleus sont pleins. Les ai-

(1) L'élevage des animaux de ces trois souches fera l'objet d'une publication ultérieure (Georges Antoine, Jeanne Lévy, Marie-Thérèse Regnier). Ces trois élevages furent organisés par Jeanne Lévy pour avoir, quelles que soient les différences de sensibilité que présentent les animaux, au moins une souche pour laquelle l'étalon international provoque, dans les conditions du contrôle, une mortalité de 25 à 40 p. 100 des animaux.

guilles utilisées sont des aiguilles de 15 5/10e à bise au court.

C'est avec ce matériel que j'ai effectué toutes mes expériences, et, en particulier, les essais de toxicité du Novarsénobenzène.

Le Novarsénobenzène ou Néoarsphénamine ou 914, est le diamino-dihydroxyarsénobenzène-monométhylène-sulfoxylate de sodium. Il a pour formule :



$$\begin{matrix} OH \\ NH_2 \end{matrix}\!\!>C_6H_3 - As = As - C_6H_3<\!\!\begin{matrix} OH \\ NH.CH_2SO_2Na \end{matrix}$$

C'est une poudre jaune clair, légère, à odeur faiblement alliacée. Elle est facilement soluble dans l'eau, presque insoluble dans l'alcool, absolument insoluble dans l'éther.

Il existe un produit standard constitué par un échantillon de diamino-dihydroxyarsénobenzène-monométhylène-sulfoxylate de sodium. Il est délivré en ampoules scellées de 0 gr., 3. Le nouvel étalon conservé à Londres par les soins du Professeur Dale, a remplacé, en 1936, le précédent qui était déposé à Francfort.

Pour les essais de toxicité, la méthode suivie fut celle du Codex que je reproduis ci-dessous :

Essai de toxicité sur la Souris,

« Dissolvez 0 g., 85 de produit dans 100 cm³ de soluté stérilisé de chlorure de sodium à 0,6 p. 100. Injectez lentement cette solution maintenue à 30° dans une veine latérale de la queue, au moyen d'une aiguille appropriée montée sur une seringue divisée en vingtièmes de centimètre cube, à raison d'un vingtième de centimètre cube par gramme d'animal. Effectuez cette injection sur 20 Souris pesant de 14 à 20 g., mais choisies de manière à être toutes d'un poids identique.

Après l'injection, conservez les animaux en observation pendant quatre jours, à la température de 18° à 25°, dans des bocaux garnis d'ouate et de graines alimentaires.

Si, au début du cinquième jour il y a moins de 12 Souris survivantes, le produit ne doit pas être mis en vente. »

Avant d'entreprendre l'étude pharmacodynamique des arsenicaux trivalents, j'ai estimé nécessaire de tracer les courbes de toxicité, d'une part, de la Néoarsphénamine standard et, d'autre part, du 914 que je devais utiliser pour mes expériences.

J'ai donc recherché pour les Souris des trois élevages du Laboratoire, les pourcentages de mortalité obtenus avec

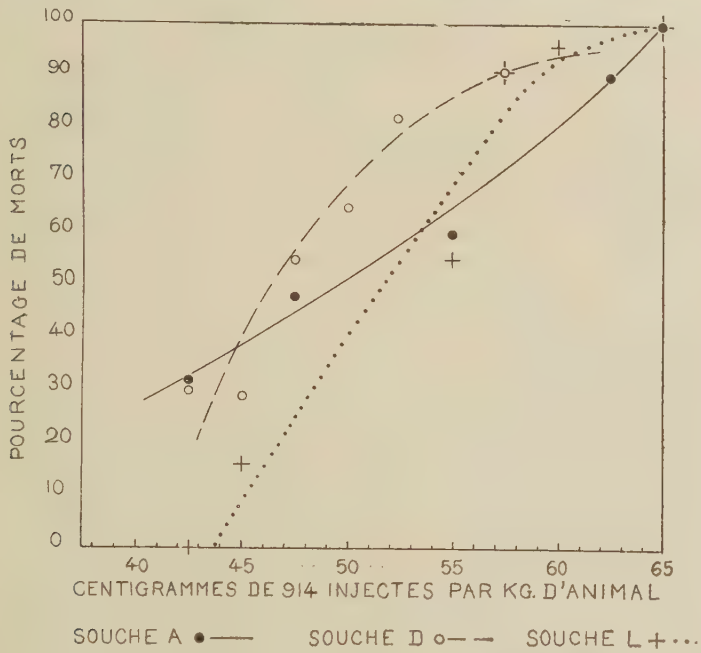


Fig. 1. — Courbe de toxicité de la Néoarsphénamine Standard.

des doses croissantes de l'un et de l'autre produit. J'utilisai des Souris mâles de 15 g. Chaque série comprenait 40 à 50 animaux. Les résultats sont représentés sous forme de courbes dans les figures 1 et 2.

Leur examen montre immédiatement que les courbes diffèrent avec la souche utilisée. Ceci n'est pas pour nous étonner. De nombreux auteurs mentionnent ce fait pour

différentes substances. Sampson et Latven notent que diverses souches de Rats albinos ont des tolérances différentes à la Néoarsphénamine.

Une autre observation semble plus intéressante. Chaque courbe conserve son aspect caractéristique, que l'on consi-

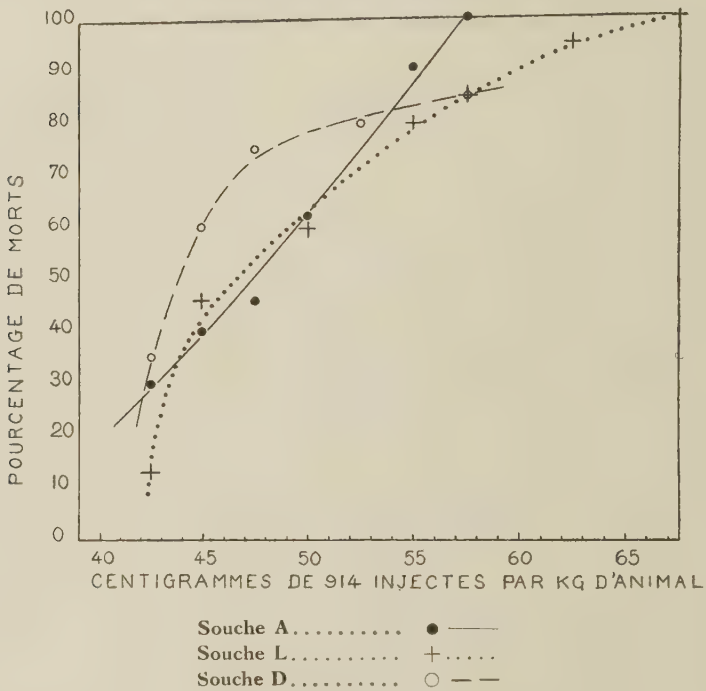


Fig. 2. — Courbes de toxicité du Novarsénobenzène A.

dère les résultats obtenus avec le 914 standard ou ceux donnés par le 914 A.

Je me suis proposé de rechercher la cause de cette sensibilité spécifique d'une souche déterminée.

Toutes les souches de Souris sont traitées identiquement, même température, même degré hygrométrique de l'atmosphère de la salle, même régime. Rien apparemment ne semble les distinguer les unes des autres. Mais si l'on

observe attentivement les courbes de croissance des mâles, on note des différences.

Les mâles de la souche D, qui apparaissent comme les plus sensibles aux 914, ont la croissance la plus rapide. 25 p. 100 d'entre eux atteignent 15 g. avant le 31e jour de leur existence, 29 p. 100 du 32e au 35e et toutes pèsent 15 g. avant le 40e jour.

Les mâles de la souche A, dont la sensibilité est intermédiaire entre celles des deux autres souches, atteignent moins rapidement 15 g. et 58 animaux ne pèsent ce poids qu'entre leur 36e et 40e jour.

La croissance est encore plus lente pour les mâles de la souche L dont 31 p. 100 de mâles n'atteignent 15 g. qu'après le 40e jour.

TABLEAU I.

Croissance des mâles des différentes souches.

Souche	Pourcentages de mâles atteignant 15 g.			
	avant le 31e jour	du 32e au 35e jour	du 36e au 40e jour	après le 40e jour
D	25	29	46	
A	15	27	58	
L	4	23	32	31

Le tableau 1 résume les résultats obtenus et son examen permet de classer dans l'ordre de rapidité de croissance décroissante les souches D, A et L. Cet ordre étant précisément celui de la sensibilité décroissante aux 914.

Voulant confirmer ces résultats, j'ai recherché les différences de sensibilité existant selon l'âge, pour une souche déterminée.

J'ai utilisé trois lots de Souris. Dans le premier, les animaux de 25 jours environ pesaient 10 g. ; ceux du second avaient à peu près 30 jours et un poids de 15 g., enfin, les

mâles du troisième lot pesaient 20 g. vers le 40e jour. Les pourcentages de mortalité ont été les suivants, après injection de 0 g., 45 de 914 B par kilogramme d'animal :

1er lot : 70 p. 100.
2e lot : 60 p. 100.
3e lot : 30 p. 100.

Deux facteurs entrent en jeu dans l'expérience précédente. L'âge et le poids variant simultanément, il est difficile d'attribuer à l'un ou à l'autre les différences de toxicité observées.

J'ai donc, dans un second groupe d'expériences, choisi des animaux qui pour le même poids avaient des âges différents. Ceci a un autre inconvénient, c'est que j'ai utilisé forcément des animaux à croissance anormale, trop rapide pour les uns, trop lente pour les autres. Les résultats, toutefois, furent parfaitement concordants avec les précédents. A poids égal les Souris les plus âgées sont les moins sensibles aux 914. Hammett et Nowrey ont noté la plus grande résistance des rats âgés, à l'arsenic. Ce fait pourrait expliquer les différences de sensibilité des trois souches.

En effet, les essais de toxicité sont faits sur des mâles de 15 g. Mais si le poids est constant, l'âge des animaux utilisés varie suivant les souches, ceux de la souche L sont plus vieux que ceux de la souche A qui eux-mêmes sont plus âgés que ceux de la souche D.

D'autre part, lors des essais des arsenicaux, j'ai souvent remarqué que, lorsqu'un élevage allait particulièrement bien et que la croissance des animaux s'accélérait, la sensibilité des animaux augmentait.

Les animaux de la souche D, vers Pâques 1936, furent malades. Un certain nombre succombèrent spontanément et ce n'est qu'à partir de janvier 1937 que l'élevage reprit peu à peu. Or, les essais de la Néoarsphénamine standard, effectués avec une solution à 0 g., 85 p. 100 cm³ de soluté

physiologique, donnèrent des mortalités qui successivement furent de 30 p. 100, 60 p. 100 et jusqu'à 80 p. 100.

Les différences de résistance dans une même espèce sont bien connues et Taylor et Ahuja ont montré que les Souris blanches élevées à Kasauli aux Indes et provenant de Souris importées d'Angleterre, ne réagissent pas de la même façon à l'action toxique du Novarsénobenzène que les Souris traitées en Angleterre. Les auteurs ont trouvé que chez les Souris élevées à Kasauli, 0 g., 3 par kilogramme exerce, au point de vue de la toxicité, la même action que 0 g., 43 chez les Souris utilisées en Angleterre.

i, dans ce cas et dans certains autres, changement de régime, par exemple, on peut soupçonner la cause des variations de la sensibilité, il est souvent impossible d'en trouver les raisons.

Je relève, toujours pour le 914 standard, des pourcentages de mortalité, obtenus avec la souche A, variant de 10 à 60 p. 100 avec une dose identique et dans des conditions aussi rigoureusement constantes que possible.

Trévan note également de grandes variations d'action présentées par l'insuline. Il ne mesure pas, dans ce cas, le pourcentage de mortalité mais le pourcentage de Souris présentant des convulsions. Il constate qu'il y a, à certaines époques, déplacement de toute la courbe caractéristique, c'est-à-dire variation de sensibilité de tout le stock de Souris, sans du reste qu'il en puisse soupçonner la raison.

J'ai moi-même observé de tels déplacements des courbes de toxicité dans le temps. Ceci apporte une difficulté à leur établissement. Le nombre des animaux disponibles, à un moment donné, est plus ou moins important, et ceci limite le nombre de points des courbes qui doivent être établies dans des délais assez courts. Sinon, le nombre des points aberrants se multiplie, en raison de la variation de la toxicité avec l'époque.

Il faut utiliser, pour les expériences de toxicité, des Souris

de souche, de sexe et de poids connus. Les conditions de vie, le régime doivent être constants et soigneusement établis. J'ai pu constater que le moindre écart modifiait la sensibilité. Wien met en évidence, d'après ses expériences, l'influence du régime sur la capacité de résistance des Souris à la Néoarsphénamine. Les animaux nourris avec du pain ou de l'avoine et du lait sont plus résistants que ceux nourris avec de l'avoine seule. La moindre sensibilité est obtenue avec une alimentation de pain et de lait. D'après Hooper, Kolis et Wright, le pain blanc, l'avoine et le lait augmentent la résistance.

Mais, toutes les conditions de constance étant remplies, il est impossible de connaître la sensibilité actuelle des animaux. Un seul moyen peut permettre de la déterminer, c'est de faire, parallèlement à l'essai de la substance à étalonner, celui d'un produit standard.

Si l'on envisage plus particulièrement le cas des arsenicaux, il serait nécessaire que ce produit standard provoquât environ 50 p. 100 de mort chez les animaux utilisés. En effet, si la souche est trop sensible ou ne l'est pas assez, il est impossible de faire utilement une comparaison, les courbes de toxicité n'ayant, ainsi que Trévan l'a bien montré, de valeur réelle que dans la zone où les pourcentages de mortalité varient de 25 à 75 p. 100.

Donc, animaux suffisamment mais pas trop sensibles et essai comparatif, tels sont les deux points essentiels d'une recherche convenable de la toxicité des arsenicaux trivalents.

CHAPITRE III

Modifications de la toxicité du Novarsénobenzène suivant la voie d'introduction.

Si la toxicité de certains 914 était due à l'existence de dérivés d'oxydation, il serait probable que des différences importantes de toxicité apparaîtraient en faisant varier les voies d'introduction du produit, l'oxydation *in vivo* ne devant pas alors être identique.

Partant de cette idée, j'ai recherché, chez le Rat et chez la Souris, l'influence du mode d'administration du 914 sur la toxicité.

1° Chez le Rat.

Les conditions dans lesquelles j'ai effectué mes expériences sur le Rat sont comparables à celles exposées précédemment pour la Souris. Toutefois chez les premiers, l'injection intraveineuse n'est pas faite dans une veine latérale de la queue, mais dans la saphène préalablement dénudée.

Désirant poursuivre mes recherches sur des Rats femelles, j'ai tout d'abord recherché s'il existait une différence dans la toxicité du 914 pour les deux sexes.

Le tableau II résume les résultats obtenus.

Tableau II.

Différence de sensibilité au Novarsénobenzène suivant le sexe.

Dose injectée par kg. d'animal	Pourcentages de mortalité	
	♂	♀
0 g. 20	12	0
0 g. 225	16	15
0 g. 275	36	20
0 g. 30	60	43
0 g. 325	84	62
0 g. 35	100	81

Les femelles paraissent donc moins sensibles que les mâles mais comme je ne pensais faire que des essais comparatifs entre la toxicité déterminée par administration par voie intra-veineuse, sous-cutanée et intra-musculaire, cette différence de résistance ne m'importait guère.

J'ai toujours effectué les trois essais comparatifs sur des Rats femelles de même poids, le même jour et avec la même solution. Celle-ci était généralement à 5 p. 100.

Les résultats sont exprimés par les courbes de la figure 3 qui représentent les pourcentages de mortalité obtenus, dans les trois cas, avec le Novarsénobenzène B.

Pour avoir le même effet, il faut trois à quatre fois plus de produit par voie intra-veineuse que par voie sous-cutanée ou intra-musculaire. Ceci est pour le moins étonnant, la plupart des poisons manifestant leur action plus rapidement et à dose plus faible par voie intra-veineuse.

J'ai retrouvé des résultats comparables avec divers autres Novarsénobenzènes.

Avec le 914 A, 0 g., 225 par kilog. d'animal, par voie intra-veineuse, ne produisent pas de mort chez dix Rats et la même dose provoque neuf morts sur dix lorsqu'elle est administrée par voie sous-cutanée.

A la même dose, le 914 C a déterminé la mort de trois Rats sur dix après injection intra-veineuse, alors qu'aucun Rat n'a résisté à la même dose administrée par voie sous-cutanée.

Pour le 914 D, le résultat est à peu près identique. Aucun

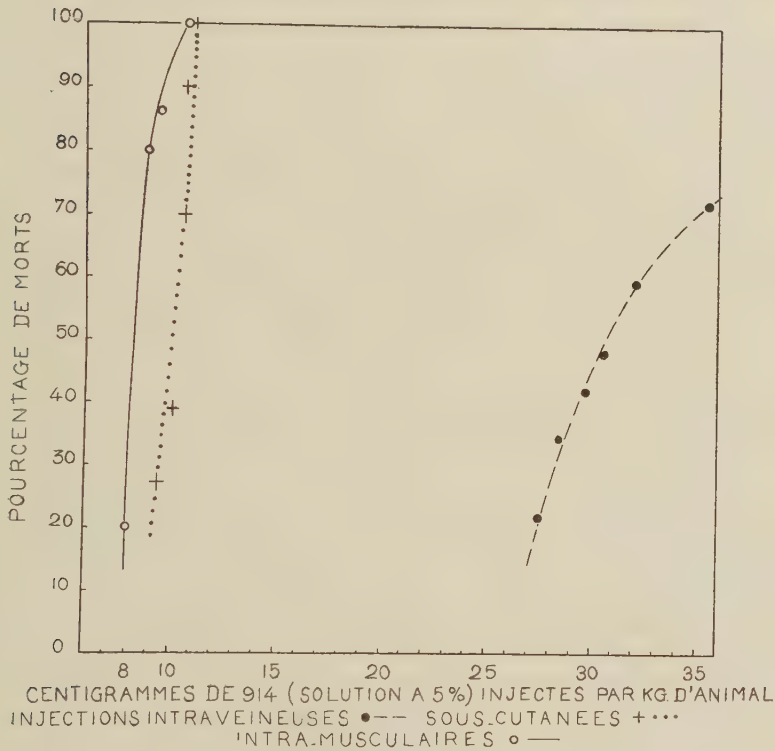


Fig. 3. — Influence de la voie d'introduction sur la toxicité du 914.

Rat ne survit après administration sous-cutanée de 0g., 225 par kilog. Par contre, un seul animal succombe si l'injection est intra-veineuse.

Je n'ai pas voulu conclure sans avoir recherché si, chez le mâle, les résultats obtenus seraient superposables.

J'ai donc injecté une solution à 5 p. 100 de 914 B, en

quantité correspondant à 0 g., 30 par kilogramme, par voie intra-veineuse. Quatre Rats sur dix sont morts. La même solution, mais avec une dose de 0 g., 10 par kilogramme, a provoqué la mort de tous les Rats que le produit ait été administré par voie sous-cutanée ou intra-musculaire. Chez le mâle comme chez la femelle, la toxicité est comparable que le produit soit introduit sous la peau ou dans le muscle. Dans les deux cas, la toxicité est, par ces voies, plus de trois fois plus grande que lorsque la voie intra-veineuse est utilisée. Ces résultats étant bien établis pour le Rat, j'ai recherché s'il était possible de les étendre aux autres espèces et tout particulièrement à la Souris.

2° Chez la Souris.

J'ai préparé une solution en faisant dissoudre 0 g., 48 de Novarsénobenzène A dans 50 cm³ de soluté physiologique. J'ai administré ce produit à deux lots de 20 Souris, au premier lot par voie intra-veineuse, au second par voie sous-cutanée.

Les Souris du premier lot vivaient encore toutes, cinq jours après l'injection. Quant aux Souris qui avaient reçu le produit par voie sous-cutanée, toutes étaient mortes le lendemain.

Il semble donc bien que l'on puisse étendre à la Souris les résultats obtenus pour le Rat. Dans tous les cas, la mortalité des individus recevant le 914 par voie intra-veineuse est beaucoup plus faible que celle des animaux à qui le produit est administré par voie sous-cutanée.

Ce fait est suffisamment particulier pour que l'on soit en droit d'en chercher la cause dans la structure intime du Novarsénobenzène.

En effet, d'une manière générale, la toxicité est plus élevée par voie intra-veineuse que par voie sous-cutanée. La dose par voie intra-veineuse peut correspondre aux deux tiers de celle par voie sous-cutanée, comme c'est le cas de la caféine, à la moitié, lorsqu'on administre de la strychnine, ou au cinquième si l'on envisage les injections de digitoxoside ou d'émétine.

Cette opposition du Novarsénobenzène et des autres produits tient-elle à son instabilité et à sa facile oxydabilité ?

Le 914 injecté par voie intra-veineuse quitte rapidement le sang et se répartit dans tout l'organisme, alors qu'administré sous la peau ou dans le muscle, il reste sur place. A l'autopsie des animaux ayant succombé à l'introduction, par l'une de ces deux voies, de Novarsénobenzène, on trouve, tout à fait localisé, un dépôt noirâtre, qui correspond, sans nul doute, au produit d'oxydation du 914.

Ces faits étant ainsi posés, j'ai pensé trouver l'explication du phénomène observé en recherchant la toxicité de ce produit d'oxydation.

Avant d'aborder cet autre point du problème de la pharmacodynamie des arsenicaux trivalents, je me suis demandé si certains facteurs ne pourraient pas atténuer ou même supprimer les différences existant entre les toxicités, suivant que le 914 est introduit par la voie intraveineuse, sous-cutanée ou intra-musculaire.

L'addition d'une faible quantité d'acide ascorbique à une solution d'arsénobenzène, laissée à l'air, retarde l'oxydation et pour certains auteurs diminuerait sa toxicité. Daïnow en 1937 montre d'ailleurs le rôle protecteur que joue la vitamine C dans les cas d'intolérance aux arsénobenzènes.

Ces faits m'incitèrent à rechercher si l'addition d'acide ascorbique aux solutions de 914 n'amènerait pas des différences dans les rapports des toxicités.

A 20 cm³ de solution de 914 B à 5 p. 100 j'ajoute 0 g., 50

d'acide ascorbique. Le liquide ainsi obtenu est administré aux Rats et les pourcentages de mortalité sont résumés dans le tableau III.

TABLEAU III.

Action de l'acide ascorbique sur les variations de la toxicité avec la voie d'introduction.

Voie d'introduction	Doses administrées	Pourcentages de mortalité
Intra-veineuse	0 g. 33	0
	0 g. 35	18
Sous-cutanée	0 g. 11	62
	0 g. 15	86
Intra-musculaire	0 g. 11	50
	0 g. 15	85

L'acide ascorbique atténue la toxicité des solutions de 914. La diminution du pourcentage de mortalité est surtout nette lorsque le produit est donné par la voie intraveineuse. La toxicité reste donc toujours beaucoup moins forte avec ce mode d'administration que lorsque la voie sous-cutanée ou intra-musculaire est utilisée.

J'ai recommencé cette série d'expériences en remplaçant l'acide ascorbique par une même quantité de glutathion réduit et les résultats obtenus furent comparables.

CHAPITRE IV

Détermination de la toxicité du produit d'oxydation du Novarsénobenzène.

Le Novarsénobenzène se présente sous la forme d'une poudre jaune clair, facilement soluble dans l'eau. A l'air, il brunit et sa solubilité diminue.

Il est tellement oxydable qu'on ne peut le préparer à l'état pur. Il est toujours mélangé à un excès de substituant, le formaldéhyde sulfoxylate de sodium et le plus souvent à une certaine quantité de sels minéraux. Il en résulte que le mélange ne contient, en général, que 20 p. 100 environ d'arsenic. Le Codex réclame un minimum de 19 p. 100 au lieu de 32,16 p. 100 que devrait renfermer la Néoarsphénamine pure.

De nombreux facteurs influent sur l'oxydation qui est plus rapide en solution qu'en poudre et varie avec la dilution et la température. Voegtlin et Smith, en 1920, montrent que les solutions alcalines se décomposent spontanément, l'oxydation cessant avec l'acidification. En 1922, Schamberg, Kolmer et Raiziss notent que l'agitation accélère l'oxydation.

Ces faits imposaient pour mes expériences des conditions rigoureuses, grâce auxquelles je pouvais espérer obtenir des produits constants.

A partir d'un 914 dont je désire étudier le comportement, je fais une solution à 5 p. 100 dans le soluté physiologique. Vingt-cinq centimètres cubes de cette solution sont versés dans un cristallisoir en verre, de 80 mm. de diamètre sur 45 mm. de haut et abandonnés à l'air et à la lumière du jour dans une pièce dont la température est de 20° environ.

Au bout d'un temps variable, selon l'expérience, le liquide est prélevé, complété à 25 cm³ avec le soluté physiologique et injecté aux animaux, pur ou dilué extemporanément au tiers.

J'ai toujours essayé la même solution avant et après aban-

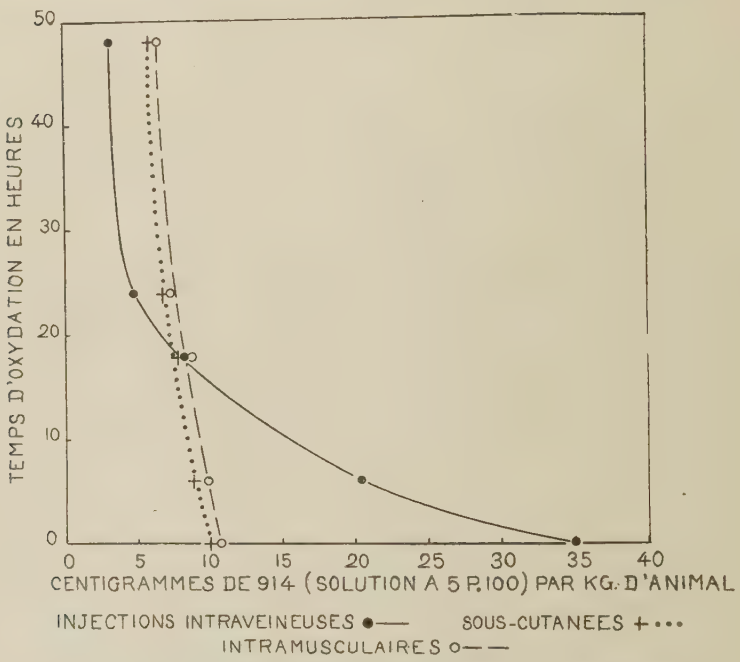


Fig. 4. — Toxicité du produit d'oxydation du Novarsénobenzène
Influence du temps d'oxydation.

Le nombre de centigrammes représente la dose nécessaire pour obtenir environ 50 p. 100 de mortalité aux divers temps de l'oxydation.

don à l'air et, dans les deux cas, par les trois voies d'introduction : intra-veineuse, sous-cutanée, intra-musculaire.

J'ai dû faire un assez grand nombre d'expériences avant de connaître, pour chaque temps d'oxydation, les doses donnant des pourcentages de mort tels qu'une comparaison puisse être établie.

Si la dose injectée est beaucoup trop forte, les animaux

meurent immédiatement. En diminuant la dose, le premier effet noté est l'allongement du temps de survie, la diminution du pourcentage de mortalité n'intervenant que secondairement.

Les résultats des expériences faites sur le Rat sont représentés sous forme de courbes dans la figure 4. L'influence du temps pendant lequel les solutions sont abandonnées à l'air sur la toxicité de celles-ci y paraît très nettement.

Après abandon de 48 heures à l'air, les solutions de 914 B ont une toxicité dix à douze fois plus grande que celle des solutions fraîchement préparées, lorsque le produit est administré par voie intra-veineuse.

Une solution non oxydée de 914 B administrée à raison de 0 g., 35 par kilogramme de Rat produit 8 morts sur 10 animaux traités. Après abandon à l'air, pendant 24 heures, l'administration de 0 g., 03 par kilogramme produit 2 morts sur 10 et après 48 heures, cette même dose produit 8 morts sur 10.

Le produit oxydé est également plus toxique que le produit non oxydé lorsque pour la comparaison on utilise la voie sous-cutanée ou intra-musculaire. Dix centigrammes par kilog. d'animal produisent, injectés par l'une ou l'autre de ces deux voies, la mort de 6 Rats sur 10. Après abandon à l'air 48 heures, 0 g., 06 produisent 9 morts sur 10. Ces essais montrent clairement que :

1° la toxicité des solutions de 914, abandonnées à l'air, croît progressivement ;

2° le produit devient, au bout de 48 heures, dix à douze fois plus toxique par la voie intra-veineuse. L'augmentation de toxicité n'est que 1,5 à 2 fois ce qu'elle était pour les voies sous-cutanée et intra-musculaire ;

3° pour les solutions fraîches, le 914 est 3 fois moins toxique par voie intra-veineuse que par les voies sous-cutanée et intra-musculaire et inversement, après

oxydation, c'est par la voie intra-veineuse que le produit devient deux fois plus toxique que par les deux autres voies.

J'ai retrouvé ces résultats avec de nombreux autres 914. D'autre part, les faits sont exactement superposables chez la Souris. Un Novarsénobenzène qui n'avait pas produit de mortalité à la dose de 0 g., 48 par kilogramme par voie intra-veineuse provoque, après abandon à l'air pendant 24 heures, 12 morts sur 20, à la dose de 0 g., 098 par kilogramme d'animal.

Cette augmentation de la toxicité par abandon à l'air des solutions de Novarsénobenzène ne doit pas être perdue de vue dans l'essai de toxicité sur la Souris lors du contrôle de ces substances. Tout doit être évité pour que les produits une fois dissous dans la solution physiologique ne restent trop longtemps au contact de l'air avant l'injection aux animaux.

La quantité de solution préparée doit être suffisamment abondante, 100 cm³ par exemple, et on a intérêt à la verser dans un récipient à étroite embouchure au fond duquel on puisera la quantité nécessaire à l'injection de la Souris. La solution ne sert que pour dix Souris et elle est refaite pour chaque lot.

Certains auteurs préconisent de mettre au-dessus de la surface libre de la solution une couche d'huile de paraffine. Nous avons, au Laboratoire, essayé les divers modes indiqués et celui que j'ai détaillé ci-dessus a donné entière satisfaction.

Cette sanction pratique des faits observés étant posée, je considérerai rapidement ce que ceux-ci apportent à la solution du problème proposé : existe-t-il une relation entre l'oxydabilité du 914 et sa moindre toxicité par voie intra-veineuse ?

Un point ressort nettement de l'observation des résultats.

Si le produit est administré non oxydé, il est plus toxique si l'injection a lieu au niveau du muscle. Lorsqu'il est oxydé, le Novarsénobenzène est plus toxique injecté dans la veine.

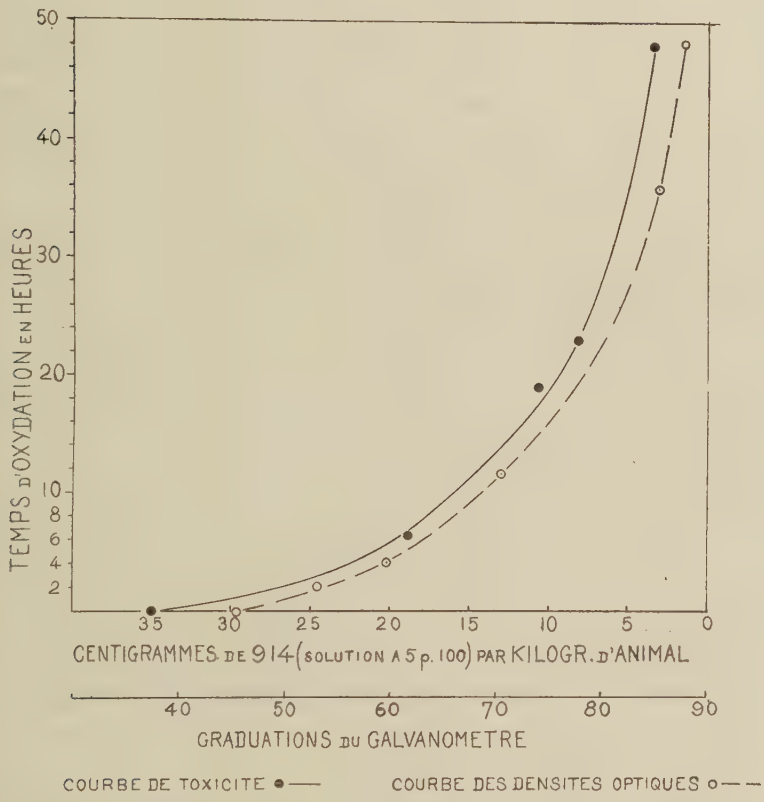


Fig. 5. — Rapport entre la toxicité et la variation de la coloration des solutions de 914 oxydé, en fonction du temps.

Si l'on pose que la toxicité est due au produit d'oxydation, on arrive forcément à la conclusion que si le produit non oxydé est plus toxique par les voies sous-cutanée et intramusculaire, c'est qu'il s'oxyde mieux à ce niveau.

Si on injecte le produit déjà oxydé, ce facteur ne joue

plus et on retombe dans la règle générale : toxicité plus grande par voie intra-veineuse.

Afin de montrer la relation existant entre l'augmentation de la toxicité des solutions de 914 oxydées, administrées par voie intra-veineuse et le degré d'oxydation de ces solutions, j'ai tracé figure 5, la courbe des densités optiques des solutions, en fonction du temps pendant lequel elles sont abandonnées à l'air. Les différents points de cette courbe ont été obtenus avec l'électrophotomètre à cellules à couche d'arrêt de Paul Meunier.

Sur la même figure, j'ai placé la courbe de toxicité des solutions de Novarsénobenzène par voie intraveineuse, en fonction du temps d'abandon à l'air de celles-ci.

Les deux courbes ont même ordonnée ; l'une a pour abcisse les graduations du galvanomètre de l'électrophotomètre, l'autre, les doses de 914 nécessaires pour obtenir un même pourcentage de mortalité.

Alors que pour la première, les grandeurs figurant en abcisse vont en croissant de gauche à droite, pour la seconde elles augmentent de droite à gauche. Ce n'est que grâce à cet artifice, que les courbes pouvaient être comparées.

En effet, au temps zéro on a la plus petite densité optique et, le produit étant moins toxique, il faut injecter la plus forte dose. Les densités optiques vont en croissant avec le temps, les doses nécessaires pour tuer 50 p. 100 des animaux diminuant rapidement.

Les deux courbes ainsi obtenues sont à peu près superposables, indiquant clairement le parallélisme existant entre l'augmentation de la toxicité par voie intraveineuse et le brunissement des solutions de Novarsénobenzène.

CHAPITRE V

Essai de généralisation des résultats obtenus.

Ces résultats acquis, je me suis demandé si d'autres substances se comportaient comme les 914 et si l'on pouvait, en particulier, retrouver des corps possédant par voie intra-veineuse une toxicité moindre que par les voies sous-cutanée et intra-musculaire. J'ai cherché, tout d'abord, parmi les autres arsenicaux trivalents, tel le Sulfarsénobenzène, puis, parmi les corps qui par oxydation ont une toxicité augmentée. La Colchicine, par exemple, appartient aux substances oxydables et Jacobj a montré que sa toxicité augmentait avec l'oxydation. J'ai donc étudié l'influence du mode d'administration sur le pourcentage de mortalité obtenue pour une dose donnée de Colchicine.

1° Sulfarsénobenzène.

Le diamino-dihydroxy-arsénobenzène-diméthylène sulfite de sodium ou Sulfarsénobenzène a pour formule :

$$\begin{array}{l} HO \\ Na.SO_3.CH_2.NH \end{array} \!\!> C_6H_3 - As = As - C_6H_3 <\!\!\begin{array}{l} OH \\ NH.CH_2.SO_3.Na \end{array}$$

Elle ne diffère donc du Novarsénobenzène que par un atome d'oxygène en plus dans les chaînes latérales sulfoxylées.

Les produits commerciaux renferment souvent une petite quantité de composé monosubstitué. En outre, on y trouve d'ordinaire un excès de substituant $OH.CH_2OSO_2Na$ et des sels minéraux. Il en résulte que la teneur en arsenic est en général comprise entre 19 et 20 p. 100 alors que la teneur théorique est de 25,05 p. 100. Le Codex demande au minimum 18 p. 100 et au maximum 20 p. 100 d'arsenic.

C'est une poudre jaune pâle, soluble dans l'eau.

Rôle de la voie d'introduction.

Le Sulfarsénobenzène s'emploie dans le traitement de la syphilis, en injection hypodermique alors que le Novarsénobenzène s'administre par voie intraveineuse.

Le Codex, lui-même, pour la recherche de la toxicité ou du pouvoir curatif prescrit d'utiliser la voie sous-cutanée pour introduire les solutions de Sulfarsénobenzène et la voie intra-veineuse pour celles de Novarsénobenzène.

J'ai recherché les différences de toxicité suivant la voie d'introduction.

Chez le Rat, la toxicité semble très voisine que le produit soit administré par une quelconque des trois voies.

Avec le Sulfarsénobenzène A, une dose de 0 g., 40 par kilogramme d'animal a produit par voie intra-veineuse la mort de 16 Rats sur 20, celle de 11 animaux sur 20 par voie sous-cutanée, alors que 14 sont morts après administration du produit dans le muscle.

Avec la Souris, on a des résultats comparables 0 g., 66 par kilogramme donne un pourcentage de mortalité égal par voie intra-veineuse et sous-cutanée. Une dose de 0 g., 70 produit la mort de 50 p. 100 des Souris par voie intra-veineuse, de 35 p. 100 par voie sous-cutanée et de 40 p. 100 par voie intra-musculaire. Les différences observées, dans les toxicités des Sulfarsénobenzènes introduits par différentes voies, sont donc faibles et, il semble qu'on puisse classer

ainsi les voies d'introduction, par ordre de toxicité décroissante :

Intra-veineuse,
Intra-musculaire,
Sous-cutanée.

ce qui cadre mieux avec les idées courantes que les résultats en apparence paradoxaux obtenus avec le Novarsénobenzène.

Rôle de l'abandon à l'air des solutions.

J'ai opéré avec le Sulfarsénobenzène exactement dans les mêmes conditions que pour le Novarsénobenzène.

Les solutions aqueuses de Sulfarsénobenzène peuvent rester à l'air sans presque changer de couleur, alors que celles du 914 prennent petit à petit une teinte brun verdâtre. Parallèlement, alors que la toxicité des dernières s'accroît dans de fortes proportions, surtout pour la voie intra-veineuse, pour les premières la toxicité augmente moins et elle croît au moins autant pour toutes les voies étudiées.

Dans une expérience, où trois lots de 20 Rats recevaient une dose de 0 g., 40 de Sulfarsénobenzène, j'ai obtenu, après abandon à l'air de la solution pendant 24 heures, 19 morts pour la voie intra-veineuse, 17 pour la voie sous-cutanée et 19 pour la voie intra-musculaire. Avec la solution fraîche, il y avait eu respectivement 16, 11 et 14 morts. Pour la Souris, l'effet de l'abandon à l'air a été semblable : légère augmentation de la toxicité qui est peut-être plus nette, là encore pour les voies sous cutanée et intra-musculaire. Le peu d'augmentation de la toxicité des solutions de Sulfarsénobenzène abandonnées à l'air s'explique fort bien par le fait bien connu que ce dérivé arsénoïque, moins toxique que le 914, est aussi plus stable. D'ailleurs, elle provoque beaucoup moins d'accidents que le Novarséno-

benzène. Il semble que ces faits puissent laisser entrevoir un rapport existant entre la possibilité d'accidents et la non-stabilité du 914, d'une part, et d'autre part, les faits constatés : toxicité par voie intra-veineuse moins forte des solutions fraîches et plus élevée des solutions oxydées.

2° Colchicine.

La Colchicine est extraite du Colchicum autumnale, L. Elle a été isolée pour la première fois, à l'état pur, vers 1880. Elle se présente dans le commerce sous deux formes : amorphe et cristallisée. La Colchicine officinale est la poudre amorphe, blanc jaunâtre, inodore, d'une saveur amère et persistante.

A l'air et à la lumière, la Colchicine s'oxyde facilement d'après Jacobj, pour donner une substance amorphe, résineuse, l'oxydicolchicine dans laquelle il semble que deux molécules de Colchicine soient liées à un atome d'oxygène.

Jacobj et Schmiedeberg supposent que la Colchicine est non toxique en elle-même et qu'elle n'agit que dans la mesure où elle se transforme en oxydicolchicine. Ceci rapproche dans une certaine mesure la Colchicine des 914 et j'ai pensé qu'il y aurait quelque intérêt à comparer l'action de ces deux produits pour essayer d'en tirer une conclusion générale.

J'ai tout d'abord recherché si je retrouverais pour la Colchicine, les variations de toxicité en fonction des voies d'introduction du poison, dans un premier temps, chez le Rat.

La toxicité a ceci de particulier, que l'écart existant entre la dose ne produisant pas de mortalité et celle qui en donne 100 p. 100 est très petit. Avec 1 mg., 9 par kilogramme d'animal, tous les animaux meurent, avec 1 mg., 5, aucun ne succombe.

La dose produisant un pourcentage de mortalité propre à l'étude de la toxicité est de 1 mg., 75 par kilogramme pour les Rats femelles de l'élevage.

J'ai pu, après ces essais préliminaires, rechercher l'in-

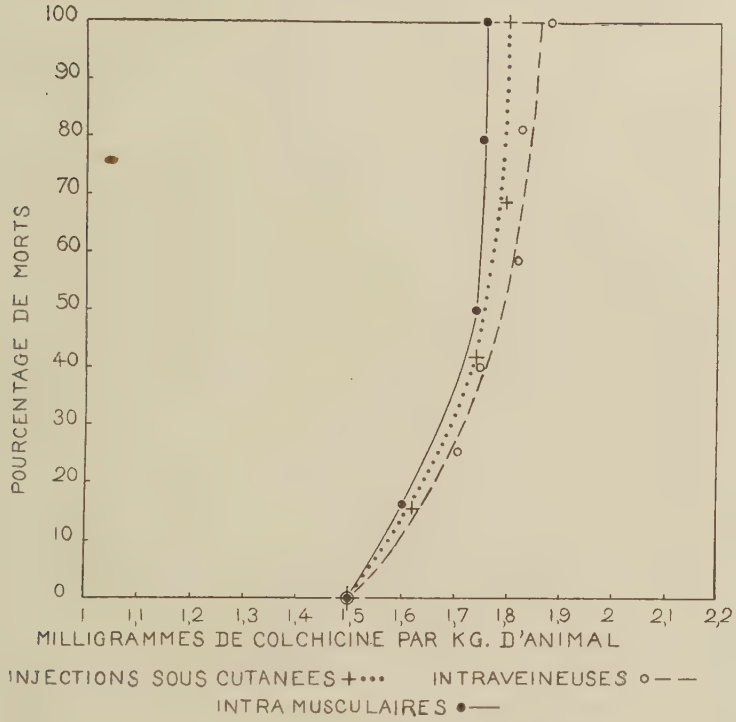


Fig. 6. — Courbe de toxicité de la Colchicine.
Influence de la voie d'utilisation (chez le Rat).

fluence de la voie d'introduction sur la toxicité de la Colchicine.

Quel que soit le mode d'administration, une dose égale ou supérieure à 1 mg., 9 par kilogramme donne 100 p. 100 de morts et une dose égale ou inférieure à 1 mg., 5 par kilogramme n'en donne pas. Les courbes de la figure 6 représentent les résultats obtenus.

En administrant par les trois voies 1 mg., 75 par kilogramme les pourcentages obtenus sont les suivants :

Intra-veineuse	40 p. 100
Sous-cutanée	42 p. 100
Intra-musculaire	80 p. 100

Avec 1 mg., 7 les mortalités sont à peu près identiques quel que soit le mode d'administration.

Pour 1 mg., 8 par kilogramme les pourcentages sont de :

Intra-veineuse	82 p. 100
Sous-cutanée	100 p. 100
Intra-musculaire	100 p. 100

Il n'y a pas de grosses différences dans la mortalité suivant la voie d'introduction utilisée ; mais, là encore, on note des pourcentages de mortalité un peu plus élevés pour la voie sous-cutanée et surtout pour la voie intra-musculaire par rapport aux chiffres obtenus pour la voie intra-veineuse.

J'ai repris ces essais sur des Souris. Les résultats obtenus sont représentés par les courbes de la figure 7. Ils sont moins nets que pour le Rat (figure 6).

Après de nombreux essais, j'ai pu fixer l'endroit intéressant de la courbe de toxicité ; il correspond au taux de Colchicine compris entre 3 mg. et 3 mg., 25.

La mortalité obtenue est identique que l'on ait administré le produit par la voie sous-cutanée ou intra-musculaire et elle serait par ces voies un peu plus faible que celle trouvée pour la voie intra-veineuse. En résumé les résultats obtenus tant sur les Rats que sur les Souris montrent que la Colchicine n'offre pas des phénomènes aussi tranchés que ceux produits par les 914. Toutefois, cette toxicité presque analogue pour les trois voies d'administration utilisées est déjà quelque peu anormale.

J'ai voulu rechercher si les différences de toxicité suivant les souches de Souris étaient parallèles, que l'on utilise un 914 ou la Colchicine. Dans un chapitre précédent, j'ai

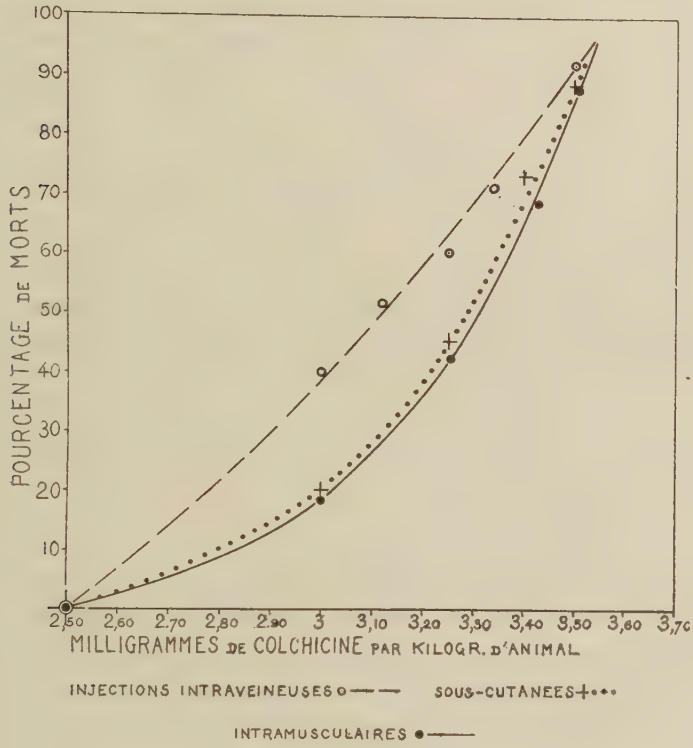


Fig. 7. — Courbe de toxicité de la Colchicine.
Influence de la voie d'utilisation (chez la Souris).

montré les différences de toxicité trouvées suivant que l'on utilise les souches A, D ou L pour l'essai de toxicité.

Dans le tableau IV, figurent les résultats obtenus avec la Colchicine administrée à la dose de 3 mg., 25 par kilogramme de Souris.

Tableau IV.

Influence de la souche utilisée sur la mortalité des Souris injectées avec de la Colchicine par une des trois voies.

Souche	Pourcentages de mortalité		
	I. V.	S. C.	I. M.
A	56	48	46
D	62	60	54
L	40	36	58

Les différences observées sont appréciables. On peut classer les souches par résistance croissante à la Colchicine : D, A, L exactement comme elles se rangeaient pour le Novarsénobenzène.

J'ai ensuite recherché si la toxicité était différente suivant le sexe envisagé.

Tableau V.

Influence du sexe des Rats sur la toxicité de la Colchicine.

Sexe	Pourcentages de mortalité		
	I. V.	S. C.	I. M.
♀	18	24	25
♂	100	100	96

J'ai injecté 1 mg., 7 par kilogramme d'animal à des Rats adultes femelles et mâles, les pourcentages de mortalité observés figurent dans le tableau V.

Enfin, j'ai recherché l'influence de l'âge. J'ai pris trois lots d'animaux. Le premier lot comprenait de jeunes Rats mâles pesant de 60 à 70 g. Dans le second lot, se trouvaient

des adultes de 110 à 115 g. Enfin, des mâles âgés dont le poids était compris entre 185 et 225 g. constituaient le troisième lot.

La quantité administrée fut de 1 mg., 65 par kilogramme d'animal. Les résultats sont consignés dans le tableau VI.

TABLEAU VI.

Influence de l'âge et du poids des Rats mâles sur la toxicité de la Colchicine.

Poids en grammes	Pourcentages de mortalité		
	I. V.	S. C.	I. M.
60-70	84	82	96
110-115	68	84	82
185-225	27	36	40

J'ai donc retrouvé pour la Colchicine la même influence de la souche, du sexe, de l'âge et du poids sur les pourcentages de mortalité ; mais les différences de toxicité suivant les voies d'introduction sont ici fort peu sensibles, surtout si on compare ces résultats, à ceux d'une particulière netteté donnés par les Novarsénobenzènes.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DE L'ACTION TRYPANOCIDE DES ARSENICAUX TRIVALENTS

CHAPITRE PREMIER

Méthodes de recherche de l'action trypanocide.

Alors que le supplément du Codex de 1931 prescrivait déjà un essai de toxicité pour le Novarsénobenzène ce n'est qu'en 1938 que figure un essai d'activité trypanocide.

Voici la technique de cet essai telle qu'elle est insérée au Codex :

« Essai d'activité trypanocide.

Pour cet essai on utilise une vingtaine de Souris infectées avec *Trypanosoma Brucei* ou avec *T. equiperdum* en injectant par la voie intraveineuse (ou même par la voie intrapéritonéale), 0 cm³ 25 d'une suspension de trypanosomes préparée comme il est dit ci-après.

Après 24 heures, on choisit pour l'essai 10 de ces Souris présentant un degré d'infestation suffisant ; 2 sont conservées comme témoins, les 8 autres sont traitées par voie intraveineuse avec des quantités de produit variant de 6,25 gamma à 10 gamma par gramme d'animal, puis, comme on l'expose ci-après, on examine tous les jours les animaux traités et les témoins. Ceux-ci succombent dans les trois jours, tandis que les animaux traités doivent survivre dans une proportion de 50 à 75 p. 100 suivant la quantité de produit injecté.

Technique de l'infection des Souris destinées à l'essai.

Utilisez 20 Souris qui seront infectées comme il est dit ci-après avec une suspension de *Trypanosoma Brucei* ou *T. equiperdum* et parmi lesquelles 10 seront choisies pour l'essai.

a) Préparation de la suspension du virus.

Prenez une souris de 17 à 20 gr. infectée, depuis 3 jours environ et reconnue suffisamment infectée par examen entre lame et lamelle d'une goutte de sang prélevée sur la queue de l'animal. Après avoir ouvert le thorax et mis le cœur à nu, en prenant les précautions nécessaires pour éviter toute hémorragie, prélevez 0 cm³ 5 de sang dans le ventricule droit par aspiration lente au moyen d'une aiguille fine montée sur une seringue divisée en vingtièmes de centimètre cube. Diluez en plusieurs fois cette quantité de sang dans la solution de chlorure de sodium à 35°, de façon à obtenir une suspension contenant environ un million de trypanosomes par centimètre cube (si la dilution ne doit pas être employée dans l'heure qui suit la ponction cardiaque, la dilution-mère sera faite dans la solution de chlorure de sodium et glucose). A cet effet, diluez d'abord au quarantième, en ajoutant 19 cm³ 5 de soluté de chlorure de sodium ; puis après examen direct d'une goutte de cette solution ou d'une solution diluée à parties égales, faites une dernière dilution dont le taux dépend de la richesse des gouttes examinées ; opérez à cet effet, dans une cellule quadrillée en dénombrant les trypanosomes qui sont contenus dans chacun des petits carrés. Procédez, s'il y a lieu, à la vérification de la richesse de la dilution définitive par numération à l'hématimètre.

b) Infection des animaux.

Utilisez 20 Souris de 17 à 20 g., mâles de préférence ou femelles non gravides. Injectez à ces Souris, par voie intraveineuse (ou par voie péritonéale) 0 cm³ 25 de la dilution ci-dessus contenant environ 250.000 trypanosomes. Après un temps suffisant (24 heures, s'il s'agit d'injection intraveineuse) examinez sur chacune de ces Souris, une goutte de sang prélevée à l'extrémité de la queue et mettez de côté les 10 premières Souris présentant 1 à 3 trypanosomes par champ du microscope (ou 100 à 300 par 100 champs). Utilisez un grossissement de 450 à 480 diamètres, objectif 7, oculaire 1, par exemple.

Traitement des animaux infectés.

Les 10 Souris choisies pour l'essai sont partagées en deux lots qui sont conservés séparément dans deux bocaux. A chacun des animaux de ces lots, une Souris étant gardée comme témoin, injectez par la voie intraveineuse une quantité de diaminodihydroxy-arsénobenzène-monométhylène-sulfoxylate de sodium correspondant à 6,25 gamma par gramme pour le premier lot et à 10 gamma par gramme pour le second, les solutions étant au titre de 1 pour 8.000 dans le premier cas et 1 pour 5.000 dans le second. Examinez tous les jours le sang des animaux traités et des témoins. Ces derniers meurent de leur infection dans les 3 premiers jours. Chez les animaux traités, les trypanosomes disparaissent du sang dans les 24 premières heures. Avec les faibles doses les rechutes, lorsqu'elles ont lieu, ne se produisent pas avant le 5e jour. Pour les fortes doses, les rechutes surviennent du 6e au 10e jour. Le nombre des animaux présentant des rechutes ne devra pas dépasser 50 p. 100 pour les faibles doses et 25 p. 100 pour les fortes doses.

Lorsque l'activité est trop forte ou trop faible, l'expérience doit être recommencée en effectuant simultanément un essai correspondant avec l'étalon international ».

De nombreux auteurs, tant en France qu'à l'étranger, ont depuis longtemps préconisé l'essai de l'activité trypanocide des arsenicaux.

Launoy, en 1936, donne les résultats de ses travaux sur ce sujet et indique les facteurs intervenant pour le résultat de l'essai curatif.

En premier lieu, il note le rôle de l'espèce animale sur laquelle on opère, ainsi que celui du virus infectant qu'il s'agit de combattre.

En second lieu interviennent :

a) l'intensité de la septicémie, chez l'animal fournisseur du virus, au moment où le sang est prélevé pour permettre l'infection des animaux destinés à être traités;

b) la valeur de la masse infectante, c'est-à-dire le nombre de parasites introduits dans l'organisme sur lequel le contrôle sera effectué ;

c) la voie d'infection : sous-cutanée, intra-péritonéale ou intraveineuse. Par la première voie, les trypanosomes apparaissent dans le sang au bout de 3 jours environ, par la seconde, 48 heures après et, par la troisième, au bout de 24 heures ;

d) l'intensité de la septicémie acquise au moment du traitement. Launoy insiste avec raison sur la non-identité de septicémies apparemment identiques, mais obtenues, par exemple, l'une après évolution courte d'une infection massive, l'autre après une évolution prolongée d'une infection faible ;

e) la voie choisie pour le traitement.

J'ai opéré, dans les expériences relatées ci-après, sur des Souris mâles de 15 g. environ. Elles reçoivent par voie intra-péritonéale 0 cm³ 25 de dilution sanguine contenant environ 250.000 *Trypanosoma equiperdum*. Il est indispensable d'employer toujours la même souche de Trypanosome. En effet, Kuhs et Tatum ont confirmé la spécificité de certains arsenicaux pour des types particuliers de Trypanosomes.

Le sang des animaux ainsi infectés est examiné 48 heures après.

Les auteurs anglais recommandent de compter à l'hématimètre le nombre des Trypanosomes. Le Codex dit de prendre les Souris présentant 1 à 3 Trypanosomes par champ du microscope ou de 100 à 300 par 100 champs.

Je n'ai pas, quant à moi, trouvé de différences dans les résultats, que les Souris aient un ou une dizaine de Trypanosomes par champ de microscope au moment de l'injection des produits. Je me range donc tout à fait à l'avis des

auteurs allemands et de Launoy, qui estiment inutile la numération à l'hématimètre des Trypanosomes dans le sang des Souris à traiter. Après avoir examiné une vingtaine de champs, je rejette les animaux qui présentent moins d'un Trypanosome ou plus de trois par champ.

Chaque lot comprend 4 Souris traitées et une non traitée qui sert de témoin. Les Souris sont examinées quotidiennement pendant 10 jours afin de noter la présence ou l'absence de Trypanosome dans une goutte de sang prélevée à l'extrémité de la queue.

CHAPITRE II

Modification de l'action trypanocide suivant la voie d'introduction du produit.

Afin de connaître le rapport pouvant exister entre la toxicité et le pouvoir curatif, j'ai recherché si celui-ci variait avec la voie d'introduction du 914.

J'ai, dans tous ces essais, dissous 0 g., 25 de Novarsénobenzène dans 100 cm³ de soluté physiologique et, à partir de cette solution, j'ai effectué des dilutions à 1/2.500, 1/4.000 et 1/6.000 dont j'injectais 0 cm³ 5. Etant donné que j'utilisais, non seulement la voie intra-veineuse, mais aussi les voies sous-cutanée et intra-musculaire, je ne pouvais injecter 1 cm³ de solution.

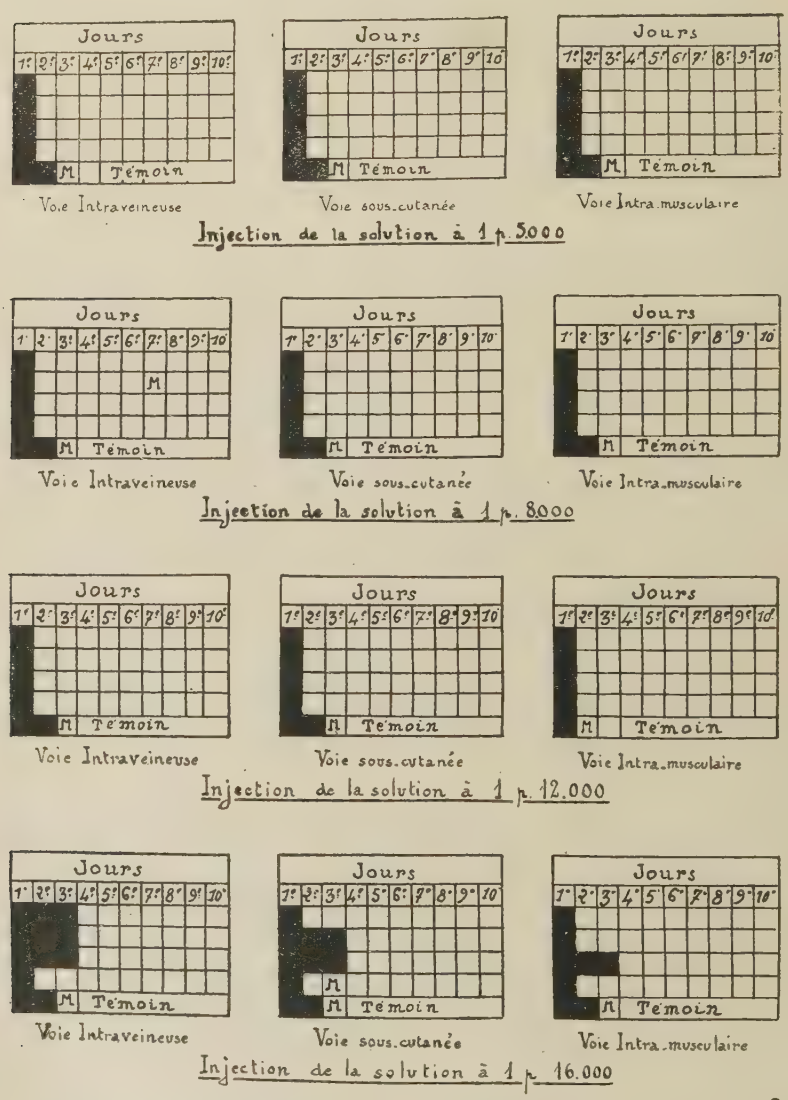
Or, je préférais injecter des solutions de même concentration dans tous les cas, car on connaît l'influence de la concentration sur la toxicité et Kroo et Y Mano, ainsi que Horster, ont montré que le Néosalvarsan était plus actif en solution diluée.

Dans les tableaux j'indique les dilutions 1/5.000, 1/8.000, 1/12.000 afin de ramener les chiffres aux indications du Codex et de faciliter, au seul examen des tableaux, la compréhension plus exacte des résultats. Certains produits étant particulièrement actifs, j'ai utilisé des dilutions plus grandes afin de voir si pour celles-ci les différences résultant de la voie d'introduction apparaîtraient plus nettement.

J'ai représenté dans les figures 8 et 9, deux types de recherche de l'action trypanocide de solution de 914.

Les rectangles représentés se décomposent en carrés.

Les numéros de la première rangée horizontale figurent les jours pendant lesquels j'examine les Souris. Au-des-



8

Fig. 8. — Action trypanocide du 914 A.
Influence de la voie d'introduction.

sous, dans chaque rangée, je note les résultats obtenus pour chaque animal, la dernière concernant la Souris témoin.

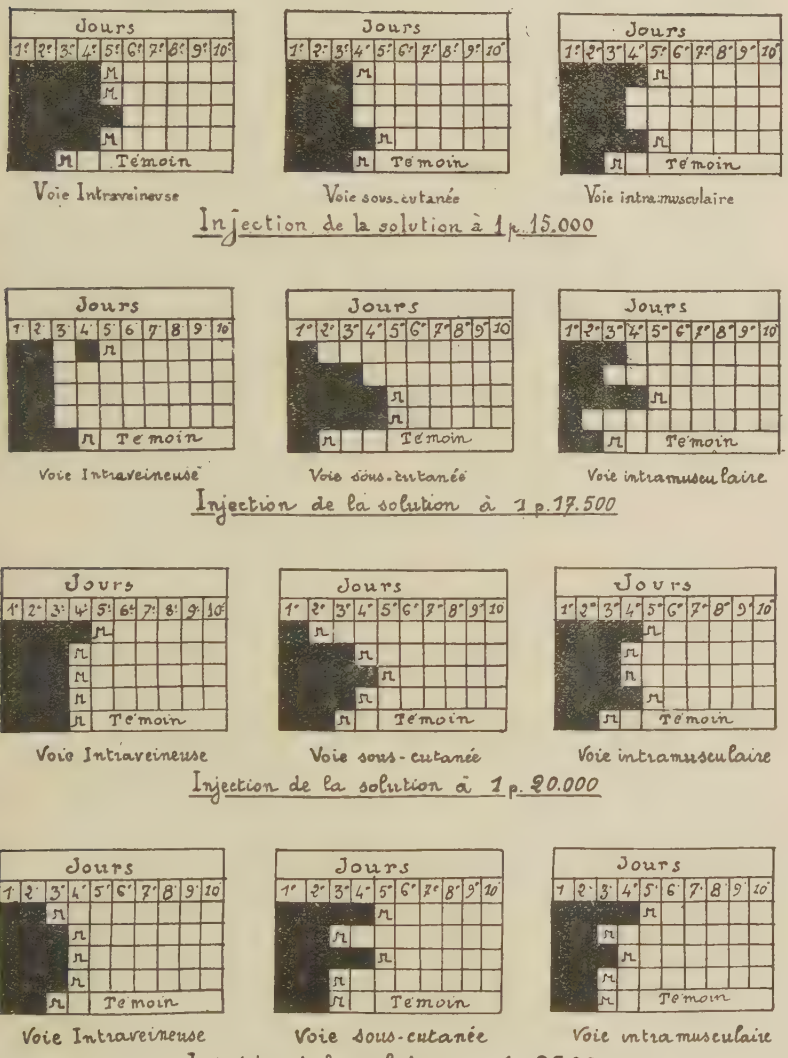


Fig. 9. — Action trypanocide du Novarsénobenzène B.
Influence de la voie d'introduction.

Lorsque l'examen du sang révèle la présence de Trypanosomes, le carré correspondant est noir.

Un M indique le jour de la mort de l'animal.

De l'examen des figures, ainsi que de nombreuses autres expériences, il résulte que l'activité trypanocide ne varie pas avec la voie d'introduction des solutions de 914. Le nombre des Souris guéries et le temps nécessaire pour leur blanchiment sont comparables dans les trois cas.

Suivant les prescriptions du Codex, le Sulfarsénobenzène doit être administré par voie sous-cutanée, pour les recherches de l'action trypanocide de ce produit. J'ai fait varier la voie d'introduction. De même que pour le Novarsénobenzène, le mode d'administration des solutions : voie intra-veineuse, sous-cutanée ou intra-musculaire n'influe pas sur l'activité du produit.

CHAPITRE III

Action trypanocide des produits d'oxydation du Novarsénobenzène.

Quelques auteurs ont recherché si le pouvoir curatif du 914 diminuait ou augmentait, après oxydation. Les avis sont très partagés. Pour les uns, l'activité du Novarsénobenzène serait due au produit oxydé et ce n'est que dans

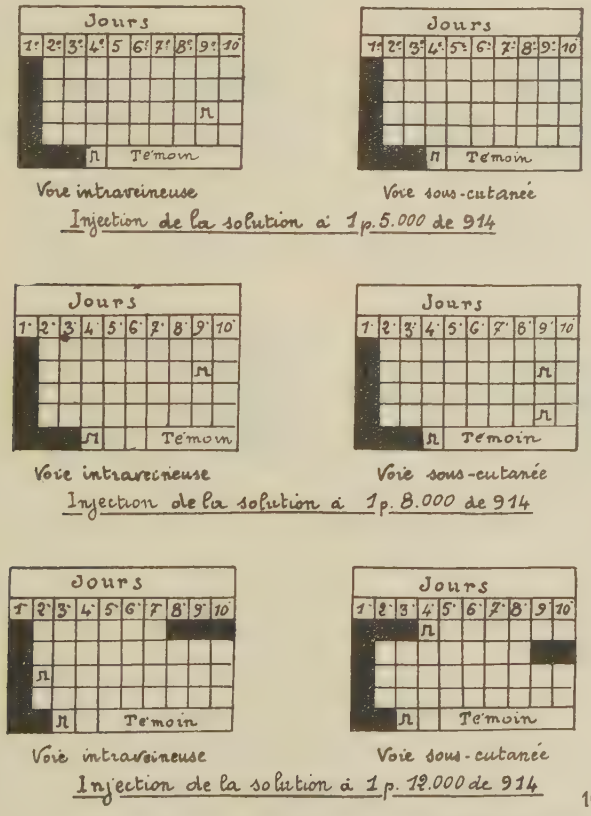
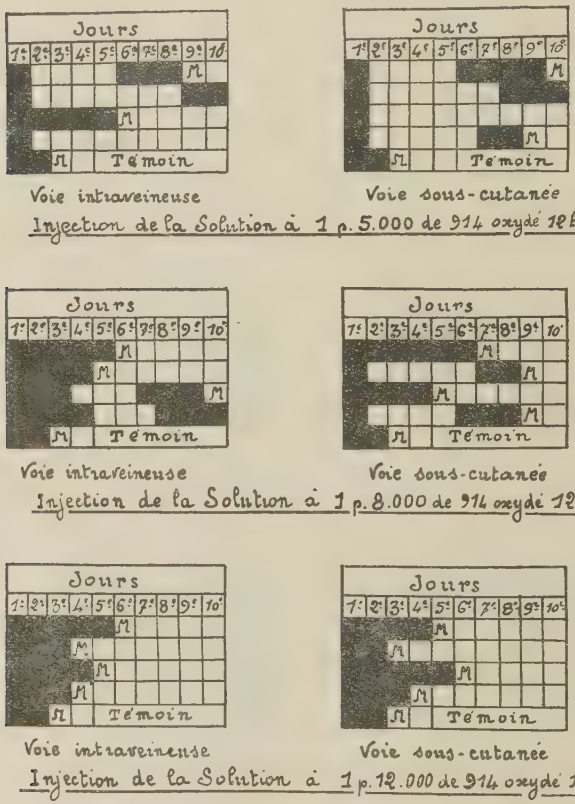


Fig. 10. — Action trypanocide d'une solution de Novarsénobenzène C.

la mesure où l'oxydation se produirait *in vivo*, que la substance agirait.

Schreus et Weisbecker, en 1926, notent pour les solutions aqueuses de Salvarsan et de Néosalvarsan laissées à



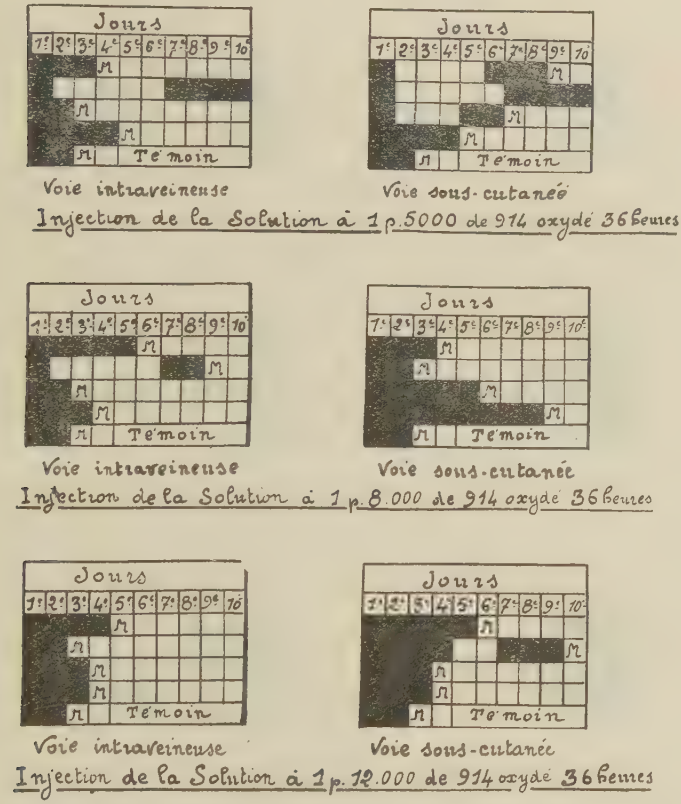
11

Fig. 11. — Action trypanocide d'une solution de Novarsénobenzène C abandonnée 12 heures à l'air.

l'air, une augmentation de l'activité, avec un optimum après 2 à 4 heures. Pour d'autres, enfin, le Novarsénobenzène en s'oxydant perdrait son activité.

Lors de la recherche des modifications de l'activité trypa-

nocide avec le mode d'administration du produit, je n'ai pas trouvé de parallélisme entre la toxicité et le pouvoir curatif, parallélisme noté par certains auteurs. En effet, le pouvoir curatif est identique, quelle que soit la voie d'in-



12

Fig. 12. — Action trypanocide d'une solution de Novarsénobenzène C abandonnée 36 heures à l'air.

troduction du 914 et la toxicité, ainsi que je l'ai établi, est beaucoup plus forte par les voies sous-cutanée et intramusculaire que par la voie intraveineuse.

J'ai donc envisagé plus directement le problème et j'ai

recherché quelles étaient les variations de l'activité trypanocide des solutions de 914 abandonnées à l'air pendant des temps variables.

J'avais, tout d'abord, pensé laisser à l'air la solution au

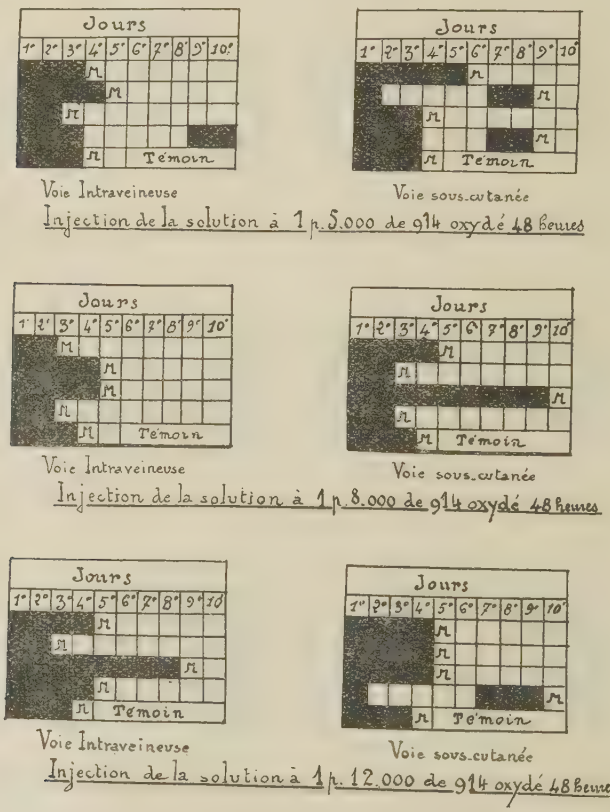


Fig. 13. — Action trypanocide d'une solution de Novarsénobenzène C abandonnée 48 heures à l'air.

1.400e à partir de laquelle je fais les dilutions, lors des essais de pouvoir curatif. J'ai dû renoncer à ce procédé car ces solutions, relativement diluées, se troublent très rapidement. Un précipité se forme et se dépose au-dessus duquel apparaît un liquide limpide jaunâtre.

Pour ces séries d'expériences, j'ai donc, comme pour la recherche des modifications de la toxicité avec l'oxydation, utilisé une solution à 5 p. 100 de 914 dans le soluté physiologique. 25 cm³ de cette solution, versés dans un cristallisoir en verre de 80 mm. de diamètre sur 45 mm. de haut, sont abandonnés à l'air. Au moment du traitement des Souris infectées, cette solution, rajustée à 25 cm³, est diluée en proportion convenable.

Les essais ont toujours été faits comparativement avec le même produit oxydé et non oxydé, sur une même série de Souris, infectées le même jour, dans les mêmes conditions.

Les injections, pour chaque dilution, ont toujours été faites par voies intra-veineuse et sous-cutanée, afin de voir si ce facteur ne jouerait pas un rôle.

Les résultats sont représentés dans les figures 10, 11, 12 et 13. Il apparaît à leur simple examen que les solutions de 914, abandonnées à l'air, perdent graduellement leur activité trypanocide, au moins dans les conditions où je me suis placée.

CONCLUSIONS

Je me suis proposé, en entreprenant ce travail, d'étudier l'existence éventuelle d'un rapport entre, d'une part, la toxicité et le pouvoir curatif des solutions d'arsenicaux trivalents et, d'autre part, l'existence dans ces solutions de produits d'oxydation.

1° J'ai tout d'abord cherché s'il était possible d'établir la courbe de toxicité type d'un composé donné. Ainsi qu'il fallait s'y attendre, j'ai constaté que la toxicité variait, pour une espèce animale, avec chaque souche. La toxicité change, en outre, avec le sexe, l'âge, le poids, le régime et l'état de santé des animaux. Les facteurs de variation sont tels que, même avec un élevage maintenu dans des conditions rigoureusement identiques : température, alimentation..., en n'utilisant pour les essais que des animaux mâles de poids et d'âge bien déterminés, la toxicité diffère, sans qu'on puisse, à coup sûr, incriminer tel ou tel facteur.

Il semble donc que, pour les essais biologiques des arsenicaux, comme pour ceux d'autres médicaments, il y a lieu de recourir à une comparaison avec le produit étalon.

2° J'ai étudié ensuite les modifications de la toxicité du 914 suivant la voie d'introduction et j'ai montré que cette substance était environ trois fois plus toxique après administration sous-cutanée ou intra-musculaire que par injection intra-veineuse.

3° Au contact de l'air, une solution de 914 brunit rapidement et l'injection du produit, obtenu après quarante-huit heures, montre une toxicité beaucoup plus grande, dix fois plus par voie intra-veineuse et seulement une fois et demi plus pour les voies sous-cutanée et intra-musculaire.

Les solutions de 914 sont donc ainsi devenues deux fois plus toxiques par voie intra-veineuse ou intra-musculaire.

La variation de la toxicité par voie intra-veineuse en fonction de la durée d'exposition à l'air des solutions suit exactement la variation de la coloration de celles-ci.

4° Ces faits paraissent particuliers au 914 et je ne les ai retrouvés, ni pour les autres arsenicaux trivalents tel que le Sulfarsénobenzène, ni pour d'autres substances telle la Colchicine, qui, cependant, d'après certains auteurs, serait également susceptible d'avoir sa toxicité modifiée par oxydation.

5° L'étude de l'action trypanocide du 914 m'a permis de constater qu'une même dose produit les mêmes effets quel que soit le mode d'administration.

6° Enfin, j'ai pu montrer qu'après abandon à l'air, les solutions de 914 perdent en grande partie, leur activité trypanocide.

Vu : le Président de la thèse,

TIFFENEAU.

Vu : le Doyen,

TIFFENEAU.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,

G. ROUSSY.

BIBLIOGRAPHIE

CHRISTIANSEN (W. G.), 1922. — The sulfur content of arsphenamine and its relation to the mode of synthesis and the toxicity. I. *Journ. of the Amer. Chem. soc.*, **44**, 847 et 2334 ; **45**, 1316.

COOPER (G. A.), 1930. — A study of the mechanism of arsenotherapy of trypanosome infection in rats. Rôle of the animal, as a whole, in therapy. *J. of Pharmacology*, **39**, 255.

DAÏNOW (I.), 1937. — Intolérance aux Arsénobenzènes et vitamine C. *Presse Médicale*, n° 94, 1670-1672.

EHRLICH, 1913. — Abhandlungen über Salvarsan, 3.

EISENBRAND (J.), 1931. — Ueber die Lichtabsorption einiger organischer Arsenverbindungen der Salvarsangruppe. *Arch. Pharmaz.*, **269**, 683.

EWINS (A. J.) and EVERETT (J. G.), 1927. — Comparative studies in organic arsenic derivatives. *Brit. Journ. of venereal dis.*, **3**, 1.

GADDUM (J. H.), 1933. — Methods of biological assay depending on a quantal response. *Medical research council Spec,*, n° 183.

GLEY (P.), 1927. — Le contrôle physiologique des Arsénobenzols. *Bull. Acad. de Méd.*, **97**, 13.

HAMMETT (F. S.), MULLER (J. H.) and NOWREY Jun. (J. E.), 1922.— The relative toxicity of germanium and arsenic for the albino rat. *Journ. of pharm. and exp. therap.*, **19**, 337.

HAMMETT (F. S.) and NOWREY Jun (J. E.), 1922. — Changes with advancing age in the resistance of the albino rat to arsenic. *Journ. of pharm. and exp. therap.*, **19**, 331.

HEFFTER (A.), 1922. — Ueber Salvarsan und die Maximaldosen. *Med. Klunk.*, **18**, 199.

HOOPER (C. W.), KOLIS (A. C.) and WRIGHT (K. D.), 1921. — Quantitative pathological studies with arsenic compounds. I. The influence of fasting and various diets on arsphenamine poisoning and the comparative toxicity of arsphenamine, neoarsphenamine and para-oxy-meta-aminophenyl arsenoxyde. *Journ. of pharm. and exp. therap.*, **18**, 133.

HORSTER (H.), 1928. — Ueber den Einfluss der Konzentration auf die Wirksamkeit verschiedener Arsenobenzolderivate. *Arb. Staatinst. exp. Ther. Frankf.*, **21**, 102.

HUNT (R.), 1921. — *Journ. of the Americ. med. Assoc.*, **76**, 851.

JURIST (A. E.) and CHRISTIANSEN (W. G.), 1934. — Fluctuations in the resistance of rats to neoarsphenamine as observed in routine toxicity tests over a period of four years. *Journ. amer. Pharm. assoc.*, **23**, 1171.

KING, 1921. — *Journ. of the Amer. Chem. soc.*, **192**, 1107 et 1415.

KROO (H.) und Y MANO, 1927. — Ueber die Bedingungen optimaler chemotherapeutischer Wirkung. Abhangigkeit der Wirkung von der Konzentration der Heilmittel. *Dtsch. med. Wschr.*, **1**, 603.

KUHS (M. L.) and TATUM (A. L.), 1937. — Specificity relationships between types of arsenicals and types of trypanosomes. *J. of Pharmacology*, **61**, 451-458.

LAUNOY (L.), 1923. — *Journ. de Physiologie.*

— 1935. — Leçons sur la toxicité. *J. Baillière et fils, Paris.*

— 1936. — Documents pour servir à l'étude de l'activité trypanocide des composés du type Novarsénobenzol. *Journ. Pharm. et Chim.*, **23**, 513-521.

LAUNOY (L.) et PRIEUR (M.), 1935. — Contribution à l'étude de l'essai biologique de la tryparsamide. *Bull. Soc. Path. exp.*, **28**, 389-398.

LEBEDEWA (M. N.) und GALANOWA (N. W.), 1932. Ueber die Sterilisierung des Zentralnervensystems durch chemotherapeutische Agentien I. Die Rolle des Temperaturfaktors bei der Therapie des Rückfallfiebers durch Salvarsan. *Z. Immun forsch.*, **74**, 298.

LEVADITI (C.) et CONSTANTINESCO (N.), 1932. — Recherches chimiothérapiques à l'aide des cultures cellulaires. Toxicité du stovarsolate de soude, de l'oxyde d'arsine et du Novarsénobenzol. *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **110**, 17.

LÉVY (Jeanne), 1930. — Essais et dosages biologiques des substances médicamenteuses. Masson édit., Paris.

LEWIN (E. M.), 1929. — Neues zur Lehre der toxischen Wirkung der Arsenobenzol-präparate auf die Leber. VI. Mitt. *Arch. f. Dermat.*, **157**, 583.

MAYER (R. L.), 1926. — Ueber den Wirkungsmechanismus des Salvarsans. *Klin. Weschr.*, **5**, 1699.

MILBRANDT (W.), 1931. — Pharmakologische. Untersuchungen über die Herabsetzung und Steigerung der Salvarsantoxizität. *Naunyn-Schmiedberges. Arch.*, **160**, 489.

MORRELL (C. A.) and CHAPMANN (C. W.), 1933. — On the determination of the toxicity of neoarsphenamine. *Journ. of pharm. and exp. therap.*, **48**, 375 et 391-409.

PENAU (H.) et SIMONNET (H.), 1932. — Règles générales de l'essai biologique des médicaments. *Journ. Pharm. et Chim.*, **15**, 116.

POMARET (M.), 1921. — Crise nitritoïde expérimentale chez le Chien par injection intraveineuse de Novarsénobenzol. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **84**, 781.

PYMAM. — *Report of the Med. res. Comm.*, n° 44.

REGNIER (J.), LAMBIN (S.) et SZOLLOSI, 1937. — Données générales sur la mesure, le calcul et l'expression du pouvoir toxique des substances médicamenteuses. *J. Physiol. Path. gén. Paris*, **35**, 329-363, 709-734, 950-968.

REINER (L.) and CLIFFORD (S. L.), 1930. — On the mechanism of chemotherapeutic action. I. Formation of the para-

sitotropic agent from arsenicals. *Proc. Soc. exp. Biol. a Med.*, **27**, 788.

RICHET fils (C.) et GLEY (P.), 1929. — Sur la toxicité de certains composés arsenicaux vis-à-vis du Trypanosome *in vitro*. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **101**, 802.

ROTH, 1920. — Toxicity of arsphenamine and neoarsphenamine. *Pub. Health rep.*, **35**, 2205.

SAMPSON (W. L.) et LATVEN (A. R.), 1937. — Comparaison des toxicités de la néoarsphénamine sur diverses souches de Rats. *Bull. Soc. chimique de France*, **11**, 610.

SANTESSON (C. G.), 1923. — Versuche über die Wirkungsweise des Neosalvarsans. *Skand. Arch. Phys.*, **43**, 55-77.

SCHAMBERG (J. F.), KOLMER (J. A.) and RAIZISS (G. W.), 1922. — The influence upon toxicity and trypanocidal activity of shaking acid and alkalinized solutions of arsphenamine and solutions of neoarsphenamine in air. *Americ. Journ. of syphilis*, **6**, I.

SCHREUS (H.Th.) und WEISBECKER (H.), 1926.— Ueber die Zusammenhänge von oxydation, diffusion und trypanocider Wirksamkeit von Salvarsanlösungen. *Arch. Dermat. u. Syph.*, **150**, 478.

TAYLOR (J.) and AHUJA (M. L.), 1935. — Toxicity tests of Novarsenobenzene in white mice bred in India. *Indian J. Med. Res.*, **23**, 91.

TREVAN (J. W.), 1927. — The error of determination of toxicity. *Proceedings of the Royal Society*, **101**, 483.

VOEGTLIN (C.) and SMITH (H. W.), 1920. — Quantitative studies in chemicotherapy III. The oxidation of arsphenamine. *J. of Pharmacology*, 16, 199.

WASMUTH (F.) 1929. — Toxicity of arsenic. *Arch. exper. Path. Pharmacol.*, **142**, 17-40.

WIEN (R.), 1935. — The increase in toxicity for mice of solutions of neoarsphenamine on exposure to air. *Quat. Journ. and Year book of Pharm.*, **8**, 631.

— 1936. — The influence of diet on the toxicity of mercurochrome and of neoarsphenamine. *Quat. Journ. and Year book of Pharm.*, **9**, 48.

— 1936. — The influence of vitamine deficiency on the resistance of rats to neoarsphenamine, mercurochrome and insuline. *Quat. Journ. and Year book of Pharm.*, **9**, 268-297.

Zolog (M.) et Comsia (O.), 1936. — Nouvelles recherches sur l'action des substances arsénobenzoliques dans les trypanosomiases expérimentales. *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **122**, 1132-1134.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 11

PREMIÈRE PARTIE. — **Etude de la toxicité des arsenicaux trivalents** 19

Chapitre I. — Notions générales sur la toxicité 21

Chapitre II. — Détermination de la toxicité du Novarsénobenzène sur la Souris blanche 29

Essai de la toxicité sur la Souris 32

Chapitre III. — Modifications de la toxicité du Novarsénobenzène suivant la voie d'introduction 39

1° chez le Rat 41

2° chez la Souris 44

Chapitre IV. — Détermination de la toxicité du produit d'oxydation du Novarsénobenzène 47

Chapitre V. — Essai de généralisation des résultats obtenus 55

1° Sulfarsénobenzène 57

Rôle de la voie d'introduction 58

Rôle de l'abandon à l'air des solutions 59

2° Colchicine 60

DEUXIÈME PARTIE. — **Etude de l'action trypanocide des arsenicaux trivalents** 67

Chapitre I. — Méthode de recherche de l'action trypanocide 69

Essai d'activité trypanocide du Novarsénobenzène 71

Technique de l'infection des Souris destinées à l'essai 71

a) Préparation de la suspension du virus 72

b) Infection des animaux 72

Traitement des animaux infectés 73

Chapitre II. — Modification de l'action trypanocide, suivant la voie d'introduction du médicament 77

Chapitre III — Action des produits d'oxydation du Novarsénobenzène 83

CONCLUSIONS 91

BIBLIOGRAPHIE 95

TABLE DES FIGURES

Pages

Figure 1. — Courbe de toxicité de la Néoarsphénamine Standard... 33
Figure 2. — Courbe de toxicité du Novarsénobenzène A..... 34
Figure 3. — Influence de la voie d'introduction sur la toxicité du Novarsénobenzène..... 43
Figure 4. — Toxicité du produit d'oxydation du Novarsénobenzène. Influence du temps d'oxydation 50
Figure 5. — Rapport entre la toxicité et la variation de la coloration des solutions de Novarsénobenzène oxydé, en fonction du temps 53
Figure 6. — Courbe de toxicité de la Colchicine. Influence de la voie d'utilisation (chez le Rat)..... 61
Figure 7. — Courbe de toxicité de la Colchicine. Influence de la voie d'utilisation (chez la Souris)..... 63
Figure 8. — Action trypanocide du Novarsénobenzène A. Influence de la voie d'introduction 80
Figure 9. — Action trypanocide du Novarsénobenzène B. Influence de la voie d'introduction..... 81
Figure 10. — Action trypanocide d'une solution de Novarsénobenzène C..... 85
Figure 11. — Action trypanocide d'une solution de Novarsénobenzène C abandonnée 12 heures à l'air..... 86
Figure 12. — Action trypanocide d'une solution de Novarsénobenzène C abandonnée 36 heures à l'air..... 87
Figure 13. — Action trypanocide d'une solution de Novarsénobenzène C abandonnée 48 heures à l'air..... 88

3032. — Imp. de la Fac. de Méd., Jouve et Cie, 15, rue Racine, Paris. — 12-1938